

Angela Puchnick Legat

Anestesia e hibridação experimental em laboratório de espécies do gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Aquicultura

Orientador: Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo

Coorientador: Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Puchnick-Legat, Angela

Anestesia e hibridação experimental em laboratório de espécies do gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) / Angela Puchnick-Legat ; orientador, Claudio Manoel Rodrigues de Melo ; coorientador, Cristiano Valentim da Silva Lazoski. - Florianópolis, SC, 2015.

112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Ostras. 3. Cruzamentos. 4. Anestésicos. 5. Marcadores moleculares. I. Melo, Claudio Manoel Rodrigues de. II. Lazoski, Cristiano Valentim da Silva. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Anestesia e hibridação experimental em laboratório de espécies do gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae)

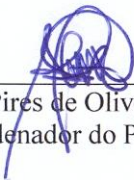
Por

ANGELA PUCHNICK LEGAT

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Presidente*



Dr. Afonso Celso Dias Bainy



Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães



Dr. Antonio Mateo Sole Cava



Dr. Gilberto Caetano Manzoni



Dr. Jaime Fernando Ferreira

Dedico este trabalho a todos que acreditam em um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Jefferson, por tudo o que compartilhamos juntos, pelo amor, pela força e pelo apoio técnico-científico durante a elaboração e execução deste trabalho. Sem ele, eu seria incompleta.

Às minhas filhas queridas Nádia e Stella, pelo amor e compreensão diante de tanto trabalho e mudanças. Obrigada por “trabalharem” comigo nos finais de semana e nas férias.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram nos estudos e em minha formação profissional. Em especial, à minha mãe pelo exemplo de coragem, dedicação e trabalho honesto.

A todos os membros da minha grande família, no Brasil e no hemisfério norte, pelo amor e pela ajuda que me deram com as meninas.

À rede OSTRAS NATIVAS que foi formada a partir de um projeto financiado pelo MPA/MCT/FINEP e que abriu perspectivas ao meu trabalho de pesquisa dentro da Embrapa e ao doutorado na UFSC em parceria com a UFRJ.

À Embrapa, pela oportunidade de ampliar o conhecimento sobre as espécies de ostras com potencial de cultivo no Brasil e contribuir para o desenvolvimento de pesquisas em benefício do meio ambiente e da sociedade.

Ao meu orientador Professor Dr. Claudio Melo, pelas discussões construtivas na parte de cruzamentos, pelo apoio, confiança e paciência ao longo do desenvolvimento desta tese.

Ao meu coorientador Professor Dr. Cristiano Lazoski, pela amizade, pelo apoio nas análises moleculares e pelo esforço pessoal e profissional direcionado à pesquisa e inovação com ostras nativas.

À toda a equipe do LMM/UFSC, professores, técnicos, funcionários, bolsistas e estagiários, pelo auxílio na compra de material, instalação e execução dos experimentos de cultivo. Além disso, agradeço pelo carinho, amizade e pelas risadas que ajudaram a amenizar o estresse e o cansaço. Em especial, obrigada Chico, Tatu, Duda, Jaque, Bê,

Alexandre, Alexandra, Aline, Khauê, Dário, Patrick, Mari, Rauh, Pancho e Simone.

À toda a equipe do LBDM/UFRJ, em especial ao Prof. Dr. Solé-Cava, Izabela, Ghennie, Nathalia, Nury, Lívia, Elisa e Itamar, pelo auxílio na realização das análises moleculares e por ajudarem a me sentir em casa.

À toda a equipe do LABCAI/NEPAQ/UFSC, em especial ao Prof. Dr. Afonso Bainy, Jacó, Clay e Flávia, pelo apoio nas análises PCR-RFLP.

À toda equipe do LAMEX/NEPAQ/UFSC, em especial à Profa. Dra. Aimê Rachel Magalhães e à Stephanie, pelo apoio na realização dos procedimentos histológicos.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro para compra de material, realização das análises no LBDM/UFRJ e apresentação de trabalhos em congressos.

À FINEP pelo auxílio financeiro dentro do projeto coordenado pelo LBDM/UFRJ, no qual foi inserido parte do trabalho da tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, em especial ao Prof. Dr. Alex Nuner pela ajuda na fase final da tese e ao Carlito pela paciência em manter os prazos e a documentação em dia.

A todos os profissionais que contribuíram no tratamento de dor crônica na minha coluna. Sem eles, não teria condições de desenvolver as atividades de esforço físico que foram demandadas ao longo da tese.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram durante o meu doutoramento. Ao pessoal do ICEF, Simone di Bernardi, Alvacir e a todos os amigos espalhados pelo Brasil e pelo mundo.

RESUMO

Com o objetivo de contribuir com conhecimentos sobre a reprodução em laboratório de ostras nativas do gênero *Crassostrea* e estudar as possíveis interações entre as espécies cultivadas no Brasil, o presente trabalho avaliou: 1) um método de anestesia e amostragem de tecido gonádico sem sacrifício de animais para a análise do estado de desenvolvimento sexual; 2) a hibridação entre a espécie de ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, e as espécies nativas, *C. rhizophorae* e *C. gasar*; e 3) o uso de marcadores de DNA mitocondrial e nuclear para a identificação de híbridos. Como resultados, o uso de Cloreto de Magnésio (50 g.L^{-1}), aplicado à água do mar, promoveu o relaxamento muscular e a abertura das valvas nas três espécies de ostras estudadas, permitindo biópsias de tecido gonádico com seringas e agulhas e a determinação do sexo dos animais. Os procedimentos de anestesia e amostragem de tecido não causaram mortalidade nestes indivíduos que apresentaram 100% de sobrevivência após 10 dias. Após o uso do anestésico, também não foram observadas alterações na atividade reprodutiva e na geração de larvas-D de *C. gigas*. A partir dos cruzamentos recíprocos entre *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar*, houve sucesso assimétrico na fecundação de oócitos de *C. rhizophorae* (R) com espermatozoides de *C. gigas* (G), oócitos de *C. gasar* (B) com espermatozoides de *C. gigas* (G) e oócitos de *C. rhizophorae* (R) com espermatozoides de *C. gasar* (B). A compatibilidade unidirecional de gametas entre as três espécies resultou na formação de larvas híbridas que apresentaram crescimento similar à espécie materna até sete dias de idade. Após este período, as larvas pararam de crescer e morreram. As análises de marcadores moleculares confirmaram que as progênies RG eram híbridos verdadeiros e continham o DNA de ambas as espécies parentais em seu genoma. A inviabilidade no desenvolvimento de larvas híbridas interespecíficas em laboratório sugere que a incompatibilidade genômica é suficiente para evitar o risco de hibridação natural entre *C. gigas* e as espécies nativas *C. rhizophorae* e *C. gasar*.

Palavras-chave: 1.Aquicultura. 2.Ostras. 4.cruzamentos. 5.anestésicos. 5.marcadores moleculares

ABSTRACT

To contribute with the knowledge on hatchery production of native oysters of the genus *Crassostrea* and to understand possible interactions between species cultured in Brazil, the present study evaluated: 1) a method of anesthesia and gonad tissue sampling for sex determination in oysters without animal sacrifice; 2) the hybridization success between the Pacific oyster *C. gigas* and the native oysters *C. rhizophorae* and *C. gasar*; and 3) the use of mitochondrial and nuclear DNA markers for the identification of hybrid status. In the results, the use of Magnesium Chloride (50 g.L^{-1} sea water) promoted valve opening in the three oyster species and enabled gonad biopsies using syringes and needles, which allow gamete evaluation of adult animals. Anaesthesia and tissue sampling procedures did not cause negative effects on animal health of the studied species, which presented 100% survival after 10 days. The anaesthetics also did not affect the reproductive activity and D-larvae generation of *C. gigas*. From reciprocal crosses between *C. gigas*, *C. rhizophorae* and *C. gasar*, it was observed asymmetry in fertilization success of *C. rhizophorae* oocytes with *C. gigas* sperm (RG), *C. gasar* oocytes with *C. gigas* sperm (BG) and *C. rhizophorae* oocytes with *C. gasar* sperm (RB). Unidirectional gamete compatibilities between species produced larvae with similar growth as their maternal species during the first seven days. After this period, hybrid larvae stopped to grow and died. Analyses of molecular markers confirmed that progenies RG integrated DNA of both parental species in their genome and were true hybrids. Unviable larval development of interspecific hybrids in laboratory conditions suggested that genome incompatibility between *C. gigas*, *C. rhizophorae* and *C. gasar* is sufficient to prevent natural hybridization.

Keywords: 1.Aquaculture. 2.Oysters. 3.interespecific crosses; 4.anaesthetics; 5.molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Espécies de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: *C. rhizophorae* e *C. gasar*..... 24

Figura 2 – Ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, introduzida e cultivada no Sul do Brasil 25

CAPÍTULO I

Figura 1 – Porcentagens cumulativas de ostras anestesiadas *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* após exposição ao $MgCl_2$ 52

Figura 2 – Porcentagens cumulativas de ostras recuperadas *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* após exposição ao $MgCl_2$53

Figura 3 – Porcentagens de fêmeas, machos e animais indeterminados amostrados e recuperados após exposição ao $MgCl_2$ nas três espécies de ostras estudadas: *C. gasar*; *C. rhizophorae*; *C. gigas* 55

CAPÍTULO II

Figura 1 – Crescimento em altura da concha (média \pm desvio-padrão) de larvas de ostras *C. gigas* (GG) e *C. rhizophorae* (RR) e larvas híbridas de fêmeas de *C. rhizophorae* com machos de *C. gigas* (RG), cultivadas em sistema de fluxo contínuo e sistema estático 81

Figura 2 – Padrões RFLP com a enzima HaeIII da região 16S do genoma mitocondrial de larvas de ostras *C. rhizophorae* (RR), *C. gigas* (GG) e larvas híbridas de fêmeas de *C. rhizophorae* com machos de *C. gigas* (RG) 82

Figura 3 – Padrões RFLP com a enzima HaeIII da região ITS-2 do genoma nuclear de larvas de ostras *C. rhizophorae* (RR), *C. gigas* (GG) e larvas híbridas de fêmeas de *C. rhizophorae* com machos de *C. gigas* (RG) 82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Valores mínimos e máximos de peso úmido e altura de ostras anestesiadas, para as três espécies do gênero *Crassostrea* estudadas (*C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas*)..... 53

Tabela 2 – Machos, fêmeas e animais indeterminados identificados a partir da amostragem do tecido gonádico de ostras anestesiadas, usando seringas e agulhas..... 54

Tabela 3 – Número médio e sobrevivência (%) de larvas-D resultantes de cruzamentos fatoriais dentro e entre grupos de ostras *C. gigas* anestesiadas e não anestesiadas..... 56

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Dados de peso total e altura da concha (média \pm desvio padrão), números de animais abertos e avaliados quanto ao sexo e números de fêmeas e machos selecionados como parentais nos cruzamentos experimentais bem sucedidos entre as espécies *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar*..... 75

Tabela 2 – Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos intraespecíficos de ostras *C. gigas* (GG), *C. rhizophorae* (RR) e *C. gasar* (BB)..... 76

Tabela 3 – Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos entre ostras *C. rhizophorae* (R) e *C. gigas* (G) 77

Tabela 4 – Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos entre ostras *C. rhizophorae* (R) e *C. gasar* (B) 78

Tabela 5. Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos entre ostras *C. gasar* (B) e *C. gigas* (G)..... 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA	19
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.2.1 Ostras do gênero <i>Crassostrea</i> cultivadas no Brasil: taxonomia, distribuição e habitat	22
1.2.1.1 Ostras nativas, <i>Crassostrea gasar</i> e <i>Crassostrea rhizophorae</i> ..	23
1.2.1.2 Ostra do Pacífico, <i>Crassostrea gigas</i>	24
1.2.2 Invasão de <i>C. gigas</i>: impactos sobre a integridade das ostras nativas	25
1.2.3 Hibridação	27
1.2.4 Reprodução de ostras do gênero <i>Crassostrea</i>	30
1.2.4.1 Reprodução de <i>Crassostrea gigas</i>	33
1.2.4.2 Reprodução de <i>C. rhizophorae</i> e <i>C. gasar</i>	35
1.2.5 Produção de sementes de ostras em laboratório	36
1.2.6 Pesquisas aplicadas ao sucesso da reprodução de ostras em laboratório	39
1.3 OBJETIVOS	42
1.3.1 Objetivo Geral	42
1.3.2 Objetivos específicos	42
2. CAPÍTULO I. ANESTESIA EM OSTRAS DO GÊNERO <i>Crassostrea</i> CULTIVADAS NO BRASIL	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	45
MATERIAIS E MÉTODOS	48
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	59
AGRADECIMENTOS	59
REFERÊNCIAS	59
3. CAPÍTULO II. HIBRIDAÇÃO EXPERIMENTAL EM LABORATÓRIO ENTRE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Crassostrea</i> CULTIVADAS NO BRASIL	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAIS E MÉTODOS	68
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	83

CONCLUSÕES	88
AGRADECIMENTOS	89
REFERÊNCIAS	89
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
4.1 CONCLUSÕES GERAIS	97
4.2 SUGESTÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	
GERAL	99

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA

A produção mundial de pescado vem crescendo nas últimas décadas, devido à rápida expansão da aquicultura que, desde a estabilização da pesca, vem contribuindo significativamente para suprir a demanda por alimento. Segundo os dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a aquicultura produziu 90,4 milhões de toneladas de peso vivo em 2012, incluindo 23,8 milhões de toneladas de algas e 66,6 milhões de toneladas de pescado. Sendo assim, a aquicultura representou 42,1% da produção mundial de pescado que totalizou 158 milhões de toneladas em 2012, cerca de 10 milhões a mais que em 2010. Entretanto, para manter um crescimento sustentável, a produção aquícola deve se tornar menos dependente dos estoques selvagens para formulação de rações, diversificando espécies e sistemas de cultivo (FAO, 2014).

Segundo a FAO (2014), das 66,6 milhões de toneladas de pescado cultivado em 2012, 66,3% (44,2 milhões) corresponderam a peixes de água doce (38,6 milhões) e peixes marinhos (5,6 milhões), 9,7% (6,4 milhões) a crustáceos e 22,8% (15,2 milhões) a moluscos. Outras espécies aquáticas (anfíbios, tartarugas de água doce, estrelas do mar, pepinos do mar, ascídias e medusas comestíveis) foram ainda marginais em termos de volume de produção (0,9 milhões).

O cultivo de moluscos é o sistema de produção que mais se aproxima de um modelo de aquicultura responsável, definido como aquele que incorpora os princípios ecológicos do funcionamento dos ecossistemas aos aspectos sociais e econômicos das comunidades (COSTA-PIERCE, 2002).

Em 2012, a malacocultura correspondeu a 60,3% da produção de pescado marinho cultivado no mundo; das 15,2 milhões de toneladas de moluscos produzidas, 14,9 milhões foram provenientes da maricultura (FAO, 2014). Da produção total cultivada em 2011 (14,4 milhões de toneladas), os moluscos de areia (“clams”) contribuíram com 34,0% (4,9 milhões), as ostras, com 32,0% (4,6 milhões), mexilhões, com 12,5% (1,8 milhões), vieiras, com 10,4% (1,5 milhões) e abalones, com 2,8% (0,4 milhões) (FAO, 2015).

A malacocultura apresenta ainda um elevado potencial de crescimento na América Latina, Caribe e África, visto que os cultivos nestas regiões são limitados por um pequeno número de laboratórios de produção de sementes e pela necessidade de domesticação de espécies

nativas (FAO, 2014). De fato, como descrito por Helm, Bourne e Lovatelli (2004), o cultivo de moluscos bivalves ao redor do mundo ainda é, em grande parte, baseado na obtenção de animais provenientes de estoques naturais sobre-explorados que não atendem a demanda de mercado. Por isso, espécies exóticas de crescimento rápido tem sido introduzidas como forma de aumentar a produtividade dos cultivos, como apoio à indústria local (RUESINK et al., 2005).

A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), é o melhor exemplo de uma espécie que foi introduzida e alavancou uma cadeia produtiva pré-existente em vários países do mundo. No entanto, esta espécie vem se tornando invasora nas regiões em que foi introduzida e vem causando ao longo dos anos efeitos negativos sobre a distribuição, diversidade e integridade de espécies nativas (MIOSSEC et al., 2009). A ocorrência de *C. gigas* em estoques naturais da costa sul do Brasil foi registrada por Melo et al. (2010a), mas ainda não se conhecem a extensão dos impactos que esta espécie poderá causar sobre as espécies nativas, *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828).

De um ponto de vista ecológico e evolutivo integrado, estudos sobre as possíveis relações entre as espécies de ostras presentes nos ecossistemas brasileiros são importantes como subsídios para programas de conservação e manejo da biodiversidade. Cruzamentos experimentais em laboratório associados a técnicas moleculares tem sido usados como ferramentas para comprovar a hibridação entre espécies de ostras (HUVET et al., 2002; BUSHEK et al., 2008; CAMARA et al., 2008; XU et al., 2009), bem como casos de heterose que possam ser vantajosos para programas de reprodução seletiva (HEDGECOCK; DAVIS, 2007; HUO et al., 2013).

A situação atual da malacocultura no Brasil encaixa-se bem no cenário reportado pela FAO (2014) para a América Latina. Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção de moluscos está concentrada em três espécies cultivadas no Estado de Santa Catarina que responde por cerca de 95% da produção nacional (BRASIL, 2013). Em 2014, o estado produziu 17.853 t de mexilhões, *Perna perna* (Linnaeus, 1758), 3.670,3 t de ostras, *C. gigas*, e 30,2 t de vieiras, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (SANTA CATARINA, 2015). Santa Catarina é o único estado que possui um sistema integral para o cultivo de ostras, desde a produção de sementes em laboratório até a comercialização (FERREIRA et al., 2011). Nos demais estados, o cultivo é baseado na engorda das ostras nativas, *C. gasar* e *C. rhizophorae*, coletadas do ambiente natural (IBAMA, 2007).

A expansão do cultivo de ostras em Santa Catarina teve início em 1991, a partir do trabalho desenvolvido pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e pela Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Apesar do esforço direcionado às ostras nativas, o crescimento se deu por meio da produção de sementes de *C. gigas* e da transferência de tecnologia aos pescadores artesanais, em conjunto com pesquisas e intercâmbio técnico-científico (FERREIRA; OLIVEIRA NETO, 2007).

Atualmente, o LMM-UFSC é o principal fornecedor de sementes de *C. gigas* e *C. gasar* no Brasil, com uma produção de 50 milhões de sementes por ano, aproximadamente (95% *C. gigas*; 5% *C. gasar*). Além do LMM, existem outros dois laboratórios de sementes de ostras no país: o “Blue Water Aquaculture”, localizado em Santa Catarina e em operação desde 1996, com uma produção anual aproximada de cinco milhões de sementes de *C. gigas*; e o laboratório-piloto da PRIMAR, no Rio Grande do Norte, implementado em 2014 e direcionado a *C. gasar*, com capacidade para até 6 milhões de sementes por ano.

Apesar de *C. gigas* representar aproximadamente 90% da produção nacional de ostras (IBAMA, 2007), o seu cultivo está restrito a águas mais frias (POLI, 2004). Consequentemente, a diversificação da ostreicultura está vinculada, em parte, à produção das espécies nativas que podem ser cultivadas ao longo de todo o litoral, especialmente em águas com temperaturas mais elevadas nas regiões norte e nordeste. No entanto, do total de 1.487,1 t de ostras nativas produzidas em 2011, 253,4 t (17%) foram provenientes de cultivo e 1.233,7 t (83%) oriundas do extrativismo (BRASIL, 2013; SANTA CATARINA, 2015). O cultivo de ostras nativas ainda não está consolidado em razão de alguns aspectos principais: (1) a dificuldade na separação das espécies para cultivo, devido à plasticidade nos caracteres fenotípicos (como cor, forma e estrutura da concha) que varia com as condições ambientais; e (2) a carência de conhecimentos sobre tecnologias de cultivo em laboratório (desova, larvicultura e assentamento), adaptadas a estas espécies, para garantir uma produção constante de sementes.

A pesquisa aplicada à ostreicultura moderna tem usado técnicas de anestesia para amostrar tecidos sem o sacrifício dos animais, permitindo estudos de reprodução em laboratório e de variabilidade genética do estoque parental para um melhor delineamento das estratégias de produção de sementes (BUTT et al., 2008; SUQUET et al., 2009; 2010). Desta forma, protocolos vem sendo desenvolvidos dentro de programas de seleção reprodutiva, em conjunto com outras

técnicas, para o entendimento dos processos envolvidos no controle da reprodução de espécies de ostras, principalmente de *C. gigas* (SUQUET et al., 2007; SONG et al., 2009; SUQUET et al., 2009; CORPOREAU et al., 2012; BOULAIS et al., 2015).

No Brasil, existem algumas informações disponíveis sobre cruzamentos entre espécies de ostras cultivadas do gênero *Crassostrea* (ABSHER, 1989; TURECK, 2010). Porém, estes estudos não foram acompanhados de análises específicas que pudessem confirmar as interações reprodutivas e genômicas entre elas. Para as espécies nativas, embora tenham sido desenvolvidos estudos sobre a viabilidade de gametas (SANTOS; NASCIMENTO, 1985; TURECK, 2010) e maturação em laboratório (RAMOS et al., 2014; GOMES et al., 2014), não há protocolos estabelecidos que possam determinar a qualidade de gametas maturados para produzir larvas capazes de se desenvolver em sementes. O presente trabalho de tese insere-se neste contexto e propõe o uso de técnicas e métodos para entender as relações entre estas espécies e contribuir no avanço do conhecimento sobre a sua reprodução em laboratório.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Ostras do gênero *Crassostrea* cultivadas no Brasil: taxonomia, distribuição e habitat

As ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) são moluscos bivalves que se caracterizam por apresentar um corpo mole coberto com duas valvas calcárias levemente assimétricas, alongadas na direção dorsoventral e unidas por um ligamento articular no ápice da concha, chamado umbo. Em condições naturais, a ostra é cimentada ao substrato pela sua valva esquerda que é maior e mais profunda do que a valva direita, a qual funciona como uma tampa (GALTSOFF, 1964).

As espécies deste gênero estão distribuídas nas zonas temperadas e tropicais do globo, em ecossistemas estuarinos e de manguezais (CARRIKER; GAFFNEY, 1996). A sua sistemática é complexa e difícil de determinar, devido aos padrões de crescimento xenomórficos e à falta de características anatômicas diagnósticas (CARRANZA et al., 2009).

A partir da década de 90, marcadores cromossômicos (LEITÃO et al., 1999; WANG et al., 2004) e moleculares (HEDGECKOCK et al., 1999; IGNACIO et al., 2000; LAPÈGUE et al., 2002; KLINBUNGA et al., 2005; PIE et al., 2006; VARELA et al., 2007; CORDES et al., 2008;

REECE et al., 2008; MELO et al., 2010b; LAZOSKI et al., 2011; LUDWIG et al., 2011; GALVÃO et al., 2013; TRIVEDI et al., 2015) vem sendo usados como ferramentas para o conhecimento do estado taxonômico das espécies e como subsídios à conservação e manejo dos estoques naturais.

No Brasil, estudos usando marcadores nucleares (aloenzimas e ITS-2) e marcadores mitocondriais (16S e COI), constataram a presença de quatro espécies do gênero *Crassostrea* em ambiente natural: duas espécies de ostras nativas, (1) *C. rhizophorae* e (2) *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) (IGNACIO et al., 2000; LAPEGUE et al., 2002; PIE et al., 2006; VARELA et al., 2007; MELO et al., 2010b; LAZOSKI et al., 2011; GALVÃO et al., 2013); (3) uma espécie de origem asiática (*Crassostrea* sp.) nas regiões norte (VARELA et al., 2007; MELO et al., 2010b), sul (TURECK, 2010) e sudeste (GALVÃO et al., 2013); e (4) a espécie *C. gigas* na costa de Santa Catarina (MELO et al., 2010a). Uma revisão mais recente do gênero *Crassostrea*, usando caracteres morfo-anatômicos, propôs mudanças na classificação taxonômica e distribuição das espécies de ostras brasileiras (AMARAL & SIMONE, 2014). Entretanto, os últimos autores não realizaram uma análise conjunta com dados moleculares e de história de vida para confirmar tal classificação.

Para as espécies-alvo deste estudo, o estado taxonômico é apresentado segundo a descrição dentro do Sistema de Informação Taxonômica Integrado (ITIS, “Integrated Taxonomic Information System”; <http://www.itis.gov/index.html>).

- Filo Mollusca;
- Classe Bivalvia (Linnaeus, 1758);
- Sub-Classe Pteriomorpha (Beurlen, 1944);
- Ordem: Ostreoida
- Família Ostreidae (Rafinesque, 1815);
- Gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897);
- Espécie *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)
Crassostrea rhizophorae (Guilding, 1828)

1.2.1.2 Ostras nativas, *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae*

As espécies de ostras nativas brasileiras ocorrem no infra-litoral e em regiões entre marés, fixadas em raízes de mangue, rochas, lama e em outras ostras (RIOS, 1994). A ostra do mangue, *C. rhizophorae* (Figura

1), é encontrada preferencialmente na zona intertidal, fixada em raízes de *Rhizophora mangle*, desde a costa do Caribe até a costa sul do Brasil (CARRIKER; GAFFNEY, 1996). A ostra *C. gasar* (Figura 1) possui ampla distribuição geográfica, estendendo-se ao longo da costa da África Ocidental Central, entre Senegal e Angola, sendo extremamente abundante no Delta do Nilo (AFINOWI, 1984), e ao longo da costa da América do Sul, desde a Guiana Francesa até o sul do Brasil (LAPÈGUE et al., 2002). No Brasil, esta espécie distribui-se do Pará até Santa Catarina (LAZOSKI, 2004; MELO et al., 2010a; MELO et al., 2010b; LAZOSKI et al., 2011), habitando o infra e meso-litoral (região mais inferior, T. Absher, com. pessoal) de costões rochosos e ecossistemas de manguezal (NASCIMENTO, 1991; CHRISTO; ABSHER, 2006). Ambas as espécies ocorrem em águas com temperatura entre 23 e 31°C e são tolerantes a variações de salinidade entre 0 a 40, com faixas ideais de 7,2 a 28,8 para *C. rhizophorae* e 8 a 34 para *C. gasar* (NASCIMENTO, 1991).

Figura 1. Espécies de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: *Crassostrea rhizophorae* (esquerda) e *Crassostrea gasar* (direita). Fotos: Simone Suhnel.



1.2.1.1 Ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*

De acordo com as informações da FAO, a ostra do Pacífico, *C. gigas* (Figura 2), é uma espécie originária do Nordeste da Ásia, onde tem uma importância histórica na aquicultura do Japão, Coreia e China. É uma espécie que habita a zona intertidal inferior até profundidades de 40 m, fixada em substratos de fundo firmes, como rochas, detritos e conchas, mas também pode ser encontrada em fundos lodosos e arenolodosos. A faixa ótima de salinidade é entre 20 e 25, mas a espécie pode ocorrer em águas com salinidade inferior a 10 e superior a 35. A faixa

de tolerância à temperatura é de - 1,8 a 35°C, com zona de conforto entre 20 e 24°C (FAO, 2005-2015).

Em vista do seu potencial para crescimento rápido e sua grande tolerância às variáveis ambientais, *C. gigas* foi introduzida como espécie aquícola em muitas regiões do mundo, para substituir os estoques sobre-explorados de espécies nativas ou para alavancar a produção local de ostras (RUESINK et al., 2005). Segundo a revisão de Miossec et al. (2009), a introdução desta espécie resultou no estabelecimento de uma indústria de malacocultura efetiva em muitos países da Europa (França, Reino Unido, Bélgica, Irlanda e Noruega), Oceania (Austrália), África (África do Sul), América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e América do Sul (Chile, Peru, Argentina e Brasil).

Figura 2. Ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, introduzida e cultivada no Sul do Brasil Fonte: <http://mat.lindner-home.net/Shells/Bivalvia>.



1.2.2 Introdução de *C. gigas*: impactos sobre a integridade das ostras nativas

As invasões biológicas são capazes de influenciar vários processos ecológicos, causando mudanças complexas na estrutura trófica dos ecossistemas costeiros (TEIXEIRA et al., 2010). Ruesink et al. (2005) reportaram 168 introduções e 14 translocações de 18 espécies de ostras em 73 países ou regiões, das quais 24 resultaram em invasão. Estes autores registraram populações naturalizadas de *C. gigas* estabelecidas em 15 de 57 países de quatro continentes onde a espécie foi introduzida.

No Brasil, a ocorrência desta espécie em estoques naturais de ostras na costa do Estado de Santa Catarina, foi confirmada por Melo et al. (2010a), através da análise de marcadores de DNA mitocondrial e nuclear. Segundo descrito por estes autores, a introdução de *C. gigas* no país teve início na década de 80, na região sudeste (Cabo Frio, Rio de Janeiro, e Cananéia, São Paulo), e depois, na década de 90, na região sul (Florianópolis, Santa Catarina).

Inúmeros exemplos dos efeitos negativos da invasão de *C. gigas* em ecossistemas costeiros ao redor do mundo foram revisados por Miossec et al. (2009), incluindo impactos ecológicos, genético-evolutivos e a introdução de patógenos. De uma maneira geral, as populações naturalizadas foram encontradas inicialmente próximas às áreas de cultivo e depois houve a colonização de áreas mais distantes, demonstrando a capacidade da espécie de dispersão e de adaptação às condições ambientais locais. Os efeitos sobre a biodiversidade estão ainda sendo investigados e discutidos, mas a competição ecológica por alimento e espaço com outras espécies filtradoras tem sido o principal impacto observado, inclusive com espécies sobre-exploradas, contribuindo para o declínio dos estoques naturais.

No Brasil, uma revisão realizada por Teixeira et al. (2010) concluiu que os estudos sobre moluscos exóticos em ambientes costeiros são escassos e não existem trabalhos que tratem das interações das espécies exóticas com as espécies nativas. No caso de *C. gigas*, apesar de as condições de temperatura na costa de Santa Catarina limitarem a obtenção de sementes no ambiente natural (FERREIRA et al., 2011), o estabelecimento da espécie no ecossistema confirma a sua grande capacidade de adaptação e torna necessário investigar a extensão dos impactos que poderá causar sobre os estoques de ostras nativas.

Segundo Blanchet (2012), a maior dificuldade de avaliar os impactos das invasões biológicas é que se trata de um processo transdisciplinar envolvendo conhecimentos de biologia fisiológica, evolutiva e ecológica aplicados ao longo de múltiplas etapas de invasão (introdução, estabelecimento, dispersão e impactos). O autor ressalta a utilidade das ferramentas moleculares modernas para fornecer informações sobre as causas ecológicas e evolutivas e as consequências das bioinvasões em diferentes níveis de organização biológica (ou seja, gene, indivíduo, população, espécie, comunidade e ecossistema).

Considerando que as espécies invasoras não compartilham de um passado evolutivo com a comunidade invadida, Souza et al. (2009) apontaram cinco tipos de mudanças a que estão sujeitas: 1) hibridação; 2) rearranjos genômicos; 3) modificação do genoma induzida pelo

estresse; 4) efeito de determinados genes; 5) efeito gargalo (“bottleneck”). No presente estudo, apenas a hibridação será revisada.

1.2.3 Hibridação

A hibridação constitui o cruzamento entre espécies, populações ou linhagens que pode ocorrer em ambiente natural ou artificial (GJEDREM, 2005). A hibridação natural entre espécies de moluscos introduzidas e espécies nativas pode representar uma séria ameaça a integridade do “pool” gênico das espécies nativas, resultando em perdas de variabilidade genética e biodiversidade aquática (PERRY et al., 2002). Por outro lado, a hibridação pode gerar o efeito da heterose ou vigor híbrido, sendo uma técnica útil no melhoramento de linhagens de cultivo, à medida que alguns grupos podem contribuir com genes de interesse, se forem compatíveis em termos de cruzamentos (ALLEN et al., 1993a). A heterose tem sido comprovada dentro do programa de cruzamentos entre linhagens de *C. gigas* (HEDGECOCK et al., 1995; HEDGECOCK; DAVIS, 2007), entre populações de vieira *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819) (ZHENG et al., 2006) e entre espécies de abalone do gênero *Haliotis* (Linnaeus, 1758) (CRUZ; GALLARDO-ESCÁRATE, 2011).

Em ostras, embora haja mecanismos isolados antes e após a reprodução para prevenir o cruzamento entre espécies e populações naturais (GOSLING, 2003), a hibridação experimental entre espécies tem sido demonstrada em alguns casos. Até a década de 90, havia poucas informações sobre desempenho e/ou fertilidade de híbridos entre espécies de ostras, principalmente devido à falta de marcadores genéticos adequados para acessar o estado híbrido (GAFFNEY; ALLEN, 1993).

Dinamani (1992), usando marcadores aloenzimáticos, identificaram a presença de dois alelos raros na ostra do Pacífico cultivada na Nova Zelândia que só tinham sido registrados na ostra nativa, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850). Isto sugere que algum grau de hibridação natural tenha ocorrido, com a introgressão de alelos de *S. glomerata* no genoma de *C. gigas* durante a história evolutiva da espécie. A compatibilidade gamética entre as duas espécies foi observada em cruzamentos experimentais, quando oócitos de *S. glomerata* foram fecundados com esperma de *C. gigas*, resultando no desenvolvimento de larvas e sementes. Porém, análises genéticas das amostras falharam em estabelecer o estado de híbridos verdadeiros.

Dentro do gênero *Crassostrea*, Rodríguez-Romero e Oca (1998) conduziram um estudo do cariótipo de larvas híbridas entre *C. virginica* (Gmelin, 1791) e *C. rhizophorae*. Os complementos cromossômicos em todos os tipos de híbridos foram integrados normalmente para formar o zigoto diploide. O número diploide encontrado foi 20 e os cromossomos dos híbridos foram similares aos cromossomos das espécies progenitoras. Em estudos subsequentes usando marcadores citogenéticos, Leitão et al. (1999) observaram o mesmo número de cromossomos ($n = 20$) também para *C. gigas* e *C. gasar*, entre outras espécies do gênero *Crassostrea*, e Leitão et al. (2007) confirmaram a viabilidade de híbridos entre *C. gigas* e *C. angulata* (Lamarck, 1819).

A hibridação natural entre *C. gigas* e *C. angulata* na costa de Portugal foi observada por Huvet et al. (2004), por meio de marcadores microssatélites. Cruzamentos experimentais entre estas espécies demonstraram ainda que: 1) os híbridos interespecíficos são férteis e nenhum isolamento reprodutivo é observado (HUVET et al., 2002); 2) existe efeito materno para características reprodutivas e de crescimento nos híbridos (SOLETCHNICK et al., 2002); 3) o desempenho dos híbridos em cultivo é intermediário ao de ambas as espécies e o desempenho de *C. gigas* é significativamente maior que o de *C. angulata* (SOLETCHNICK et al., 2002; BATISTA et al., 2007). Em conjunto, estes trabalhos ressaltaram a necessidade da conservação das populações de *C. angulata* em virtude da expansão do cultivo de *C. gigas* na Europa.

Além do caso de *C. gigas* x *C. angulata*, não há evidência de hibridação natural entre outras espécies do gênero *Crassostrea*. Em condições de laboratório, inúmeros estudos foram realizados para testar a viabilidade de híbridos interespecíficos e a hipótese de heterose. Allen et al. (1993b), demonstraram que a fecundação entre *C. gigas* e *C. virginica* foi simétrica, mas o desenvolvimento das larvas híbridas foi inviável, ocorrendo mortalidade entre o oitavo e o décimo dia de larvicultura.

Cruzamentos experimentais entre *C. virginica* e *C. ariakensis* (Fujita, 1913) realizados por Bushek et al. (2008) resultaram na formação de híbridos, indicando que o esperma de *C. virginica* foi melhor para fertilizar os oócitos de *C. ariakensis*. Marcadores nucleares (ITS1 e ITS2) confirmaram o estado híbrido de larvas com dois dias de idade, mas o desenvolvimento larval não foi viável. Segundo estes autores, a magnitude da compatibilidade reprodutiva entre as espécies depende das concentrações gaméticas e da proporção de gametas interespecíficos na água.

Camara et al. (2008) conduziram testes de compatibilidade gamética entre estoques de reprodutores de *C. sikamea* (Amemiya, 1928) e *C. gigas* no Japão e nos Estados Unidos, usando marcadores mitocondriais (COI) e nucleares (ITS1). Os autores demonstraram uma incompatibilidade unidirecional entre oócitos de *C. gigas* e esperma de *C. sikamea* nas populações japonesas, a qual foi menos evidente nos Estados Unidos, indicando barreiras menores à hibridação interespecífica em estoques cultivados comercialmente.

Xu et al. (2009) observaram uma pequena taxa de fecundação de oócitos de *C. sikamea* com esperma de *C. ariakensis*. Larvas híbridas foram confirmadas por meio de marcadores COI e ITS1 e apresentaram um crescimento similar à espécie *C. sikamea* durante os primeiros nove dias de vida, devido ao efeito materno. Após este período, a incompatibilidade genômica causou efeitos negativos sobre o crescimento e a sobrevivência, resultando em um pequeno número de sementes híbridas.

O potencial da hibridação para uso na ostreicultura foi demonstrado por Huo et al. (2013; 2014), a partir de cruzamentos entre *C. hongkongensis* e *C. ariakensis*, e por Zhang et al. (2015), através de retrocruzamentos entre *C. hongkongensis* e *C. gigas*.

Huo et al. (2013; 2014) sugeriram que os híbridos entre fêmeas *C. hongkongensis* e machos *C. ariakensis* podem substituir *C. hongkongensis* como espécie de cultivo no Norte da China. Os principais resultados que suportam essa hipótese foram: um melhor desempenho dos híbridos frente a *C. hongkongensis* em termos de sobrevivência larval em águas com temperaturas baixas (1), crescimento e sobrevivência juvenil em águas com salinidades altas (2) e crescimento adulto após 360 dias de cultivo (3).

Zhang et al. (2015) produziram artificialmente progênes retrocruzadas de *C. hongkongensis*, *C. gigas* e híbridos de fêmeas de *C. hongkongensis* com machos de *C. gigas*. Os retrocruzamentos interespecíficos foram bem sucedidos e as progênes foram viáveis e férteis, apresentando crescimento mais rápido do que as progênes dos cruzamentos intraespecíficos.

Para as espécies do gênero *Crassostrea* cultivadas no Sul do Brasil, Absher (1989) observou o desenvolvimento de larvas-D em cruzamentos experimentais entre *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* (= *C. gasar*), que foram viáveis até o nono dia de idade. Porém, não foi possível confirmar geneticamente a espécie a que pertenciam os animais usados nestes cruzamentos e, conseqüentemente, ter certeza sobre o estado híbrido das larvas resultantes. Além disso, Tureck (2010)

observou a presença de divisões celulares em fecundações cruzadas de oócitos de *C. gasar* com espermatozoides de *C. gigas* e de oócitos de *C. gigas* com espermatozoides de *C. gasar*. No entanto, não foi possível realizar as análises genéticas das larvas para confirmar a sua identidade.

1.2.4 Reprodução de ostras do gênero *Crassostrea*

A reprodução é um aspecto fundamental da história de vida de qualquer espécie e o conhecimento dos processos reprodutivos é determinante para o manejo de um recurso pesqueiro ou aquícola.

As ostras, como outros moluscos bivalves marinhos, tem ciclos reprodutivos que envolvem períodos de produção de gametas, desova, fecundação, desenvolvimento larval, assentamento, metamorfose e crescimento até a maturidade sexual. Revisões sobre a reprodução e os estágios iniciais do desenvolvimento de bivalves, incluindo a família Ostreidae, foram realizadas por Andrews (1979), Mackie (1984), Gosling (2003) e Helm, Bourne e Lovatelli (2004). Thompson et al. (1996) detalharam as informações disponíveis sobre o sucesso reprodutivo nas espécies do gênero *Crassostrea* em populações naturais e cultivadas.

Como descrito em Gosling (2003), a produção de gametas sexuais no tecido gonádico de moluscos bivalves ocorre a partir da proliferação das células germinativas que se formam na parede epitelial dos folículos. Oócitos e espermatozoides são produzidos nos folículos, por meio de divisões mitóticas e meióticas, são liberados através dos gonodutos e aberturas urogenitais para a fecundação externa. O processo de formação do oócito compreende mais estágios meióticos que se completam na fecundação e um período subsequente de vitelogênese.

O controle da reprodução envolve a interação complexa entre fatores endógenos, como patrimônio genético e processos neuroendócrinos, e fatores exógenos, como disponibilidade de alimento (em abundância e qualidade), temperatura, ciclo lunar, profundidade, intensidade luminosa, pluviosidade e salinidade (MACKIE, 1984). Estes fatores causam uma grande variação dentro e entre as espécies de bivalves, quanto à duração e à sincronização de cada fase do ciclo reprodutivo (GOSLING, 2003).

A maturação do tecido gonádico e a gametogênese variam ao longo das estações do ano, atingindo seu máximo antes do início da desova, nas épocas mais quentes (MACKIE, 1984). Para várias espécies, a disponibilidade de alimento é o fator principal que determina a

gametogênese, visto que se trata de um processo de demanda energética e dependente da reserva de nutrientes (GOSLING, 2003).

As espécies de ostras do gênero *Crassostrea* são ovíparas ou não-incubatórias e liberam oócitos e espermatozoides diretamente na coluna d'água onde ocorre a fecundação e o desenvolvimento larval (MACKIE, 1984). Em sua maioria, são organismos dioicos e apresentam razões sexuais iguais em populações naturais, embora a ausência de dimorfismo exija análises microscópicas e histológicas para diferenciar machos e fêmeas (GALTISOFF, 1964; CHRISTO; ABSHER, 2006). Estudos sugerem que algumas espécies deste gênero podem apresentar um modelo complexo de reprodução sexual, com a coexistência de dioicia, hermafroditismo ocasional e reversão de sexo, que é controlado principalmente pela disponibilidade de alimento e por mecanismos moleculares conservados (GUO et al., 1998; HEDRICK; HEDGECOCK, 2010; ZHANG; XU; GUO, 2014).

Espécies marinhas como ostras apresentam uma alta fecundidade e uma alta mortalidade nos primeiros estágios de vida, como resposta evolutiva às condições ambientais flutuantes (WILLIAMS, 1975). Segundo Thompson et al. (1996), o sucesso da reprodução em populações naturais de ostras depende da proximidade dos sexos e de sua resposta simultânea ao estímulo da desova, principalmente pelo fato de que os gametas deterioram depois de poucas horas e os oócitos mais pesados do que a água afundam rapidamente. Assim, ostras adultas respondem às mudanças ambientais de macroescala que estimulam a gametogênese e a desova quando as condições estão adequadas para a sobrevivência de larvas e juvenis. A gametogênese é sincronizada de tal forma que oócitos e espermatozoides sejam liberados concomitantemente para garantir a fecundação na água e maximizar o número de zigotos.

Como observado por Galtsoff (1964), os machos são os primeiros a iniciar a desova e são facilmente induzidos, respondendo aos estímulos de forma inespecífica. A liberação de esperma por apenas um indivíduo induz a desova de outros próximos e o processo se espalha por toda a população de ostras. As fêmeas são altamente específicas à estimulação e respondem apenas às suspensões de esperma da mesma espécie ou de espécies proximalmente relacionadas. A especificidade das fêmeas é uma garantia de que oócitos não podem ser liberados quando não há esperma na água.

Galtsoff (1964) descreveu ainda que, nos primeiros estágios de fecundação, a região do acromossomo de um espermatozoide é ativa e carrega uma substância proteica que facilita a união do espermatozoide à

membrana vitelínica do oócito e a sua penetração no citoplasma. Brandriff, Moy e Vacquier (1978) confirmaram que esta proteína, empacotada na forma de grânulos insolúveis (“bindin”), é responsável pela aglutinação dos oócitos não fecundados e pelo reconhecimento espécie-específico do espermatozoide a um receptor glicoproteico na superfície do oócito. Desta forma, embora vários espermatozoides possam se ligar a um oócito, apenas um penetra no citoplasma. Entretanto, se a concentração de esperma na água for muito alta, vários espermatozoides podem entrar em um oócito e causar a poliespermia que pode interferir no desenvolvimento embrionário normal (GALTSOFF, 1964).

Gosling (2003) sugeriu que mecanismos de isolamento reprodutivo antes e após a fecundação existem para prevenir o cruzamento entre espécies de moluscos na natureza. Mesmo dentro de uma espécie, há mecanismos que regulam o processo de fecundação, por exemplo, sistemas de incompatibilidade gamética que previnem ou regulam a autofecundação em espécies hermafroditas. Dentro do gênero *Crassostrea*, estudos documentaram variações intraespecíficas (MOY et al., 2008) e interespecíficas (WU et al., 2011) nos sistemas moleculares de reconhecimento gamético. Para a espécie *C. gigas*, Moy et al. (2008) propuseram que o alto polimorfismo detectado nas proteínas de reconhecimento de espermatozoides é regulado geneticamente para evitar a poliespermia, aumentando a intensidade do conflito sexual na fecundação.

A partir da fecundação, os oócitos passam por divisões meióticas para reduzir o número de cromossomos a um número haploide antes dos pró-núcleos da fêmea e do macho fusionarem-se para formar o zigoto. Dois corpúsculos polares são liberados durante a divisão meiótica e, quando aparentes, indicam sucesso da fecundação. Aproximadamente, dentro de 30 a 45 min após a fecundação, os oócitos fecundados atingem o estágio bicelular e, dentro de 24 h, passam através dos estágios multicelulares de blástula e gástrula até se desenvolverem em larvas trocóforas ciliadas (GALTSOFF, 1964). Na fase embrionária, as reservas de lipídio, proteína e glicogênio que foram armazenadas nos oócitos são consumidas pelas larvas que se são produzidas em grandes números e se dispersam na coluna d’água (GOSLING, 2003).

Segundo a revisão de Gosling (2003), o estágio inicial de desenvolvimento é denominado prodissoconcha I, no qual a larva possui uma concha em formato de D com duas valvas, um sistema digestório e um órgão ciliado chamado velum que pode ser projetado por entre as valvas. A alimentação inicia-se logo após a formação do velum que

permite que a larva nade para se manter na coluna d'água, enquanto coleta fitoplâncton, matéria orgânica dissolvida, detritos e bactérias. Dentro de uma semana de idade, aproximadamente, a larva veliger (com 100 a 120 μm de comprimento de concha) secreta uma segunda concha com linhas de crescimento e uma região denominada umbo que se torna mais proeminente no estágio prodissoconcha II. Quando a larva se aproxima da maturidade, desenvolve um pé, brânquias rudimentares e pequenos pontos circulares pretos (as manchas oculares) próximos ao centro de cada valva. Entre períodos de atividade natatória, a larva pediveliger assenta e usa o pé para rastejar e encontrar um substrato adequado, quando então passa por uma metamorfose e começa a sua existência bentônica. Larvas de ostras secretam um pequena gota de cimento de uma glândula no pé, rolam e deixam a valva esquerda nela, permanecendo fixadas neste local pelo resto de suas vidas. Após a metamorfose, a dissoconcha é secretada, semelhante à concha do animal adulto em pigmentação, ornamentação e conteúdo mineral.

A duração do desenvolvimento larval varia de 18 a 30 dias e o tamanho da maturidade larval é de 200 a 330 μm , dependendo da espécie e das condições ambientais (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004). Mortalidades massivas ocorrem durante a fase de vida pelágica, relacionadas aos padrões de deslocamento horizontal e vertical das larvas na coluna d'água, que são dependentes da circulação oceânica, da disponibilidade de luz e alimento, da temperatura e da salinidade (ANDREWS, 1979). Mortalidades consideráveis podem ocorrer também durante a metamorfose, quando as larvas sofrem uma reorganização morfológica para mudar de uma existência planctônica para uma existência bentônica (GOSLING, 2003).

1.2.4.1 Reprodução de *Crassostrea gigas*

De acordo com as informações disponíveis na FAO, a ostra do Pacífico é uma espécie hermafrodita protândrica, cujos indivíduos, em sua maioria, maturam primeiro como machos e subsequentemente podem mudar de sexo de acordo com as condições de disponibilidade de alimento (FAO, 2005-2015). As determinantes genéticas do sexo em *C. gigas* foram demonstradas através de análises das razões sexuais de famílias e da proposição de modelos genéticos (GUO et al., 1998; HEDRICK; HEDGECOCK, 2010). Estes modelos, porém, não incluíam informações sobre os genes relacionados com os mecanismos de determinação sexual que foram investigados por Zhang, Xu e Guo

(2014), através de análises do transcriptoma do tecido gonádico de machos e fêmeas. Segundo estes últimos autores, a grande variação na expressão de genes determinantes do sexo em machos suportam o modelo proposto por Guo et al. (1998), o qual reconhece dois genótipos de machos: machos FM que não sofrem reversão sexual e machos FF que podem mudar de sexo para fêmeas.

A produção de gametas e a composição bioquímica em *C. gigas* são moduladas por mudanças sazonais na abundância de fitoplâncton e na temperatura da água, havendo uma sincronização entre a quebra de glicogênio e o acúmulo de lipídios (RUIZ et al., 1992). Segundo a revisão da FAO (2005-2015), a gametogênese nesta espécie inicia-se nos meses de inverno, em torno de 10°C e em salinidades de 15 a 32. Fêmeas maduras de 8 a 15 cm produzem entre 50 e 100 milhões de oócitos com 50 a 60 µm de diâmetro em uma única desova que, no ambiente natural, ocorre em temperaturas acima de 20°C. As larvas medem 70 µm de comprimento de concha no estágio prodissoconcha I e o desenvolvimento embrionário ocorre durante duas a três semanas, período em que as larvas se dispersam na coluna d'água até assentarem no fundo para completar a metamorfose ao estágio juvenil.

Com base na interação entre fatores ambientais e genéticos, modelos desenvolvidos por Powell et al. (2002) e Hoffman et al. (2004) sugeriram que: 1) níveis ótimos de temperatura e salinidade aumentam a sobrevivência larval em áreas com baixa disponibilidade de alimento, permitindo um aumento da taxa de ingestão e da eficiência de crescimento; 2) o equilíbrio da composição do alimento influencia no recrutamento das larvas ao estágio juvenil, à medida que o encurtamento do estágio larval depende da disponibilidade de proteína para um crescimento mais rápido e o sucesso na metamorfose é obtido por um aumento do armazenamento de lipídios; 3) variações das condições ótimas de temperatura, salinidade e composição do alimento aumentam o tempo de duração do estágio larval e reduzem a sobrevivência das larvas; e 4) estas variações ambientais reduzem a variação genética populacional, favorecendo larvas oriundas de ovos grandes com alta eficiência de crescimento.

Em relação à *C. gigas* cultivada no Sul do Brasil (SC), a espécie elimina gametas preferencialmente no final da primavera, em novembro, e secundariamente no final do verão, em março, períodos em que a temperatura da água varia de 26 a 30°C (FERREIRA et al., 2004). Este padrão de temperatura pode dificultar o recrutamento de larvas e a obtenção de sementes no ambiente natural, tornando obrigatório o estabelecimento de um sistema de produção em laboratório, com um

setor de maturação para obter gametas viáveis em diferentes épocas do ano (FERREIRA et al., 2011).

1.2.4.2 Reprodução de *C. rhizophorae* e *C. gasar*

Como até pouco tempo as espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) eram consideradas sinônimas (RIOS, 1994), muitos estudos que trataram especificamente de uma dessas espécies podem ter usado exemplares de ambas (LOPES et al., 2013; CASTILHO-WESTPHAL et al., 2015). Por isso, as informações devem ser vistas de forma cuidadosa.

Para a espécie *C. rhizophorae* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, a gametogênese ocorre ao longo do ano e sem um período de repouso sexual, devido às pequenas variações de temperatura (NASCIMENTO, 1991). A espécie tolera a influência de fatores intrínsecos e extrínsecos e não passa por mudanças significativas em sua atividade reprodutiva (FERREIRA et al., 2006). No entanto, a salinidade exerce um estímulo desencadeador no processo de liberação dos gametas que é perceptível em épocas de maior precipitação pluviométrica (LENZ; BOEHS, 2011). Esse padrão reprodutivo é também observado para a espécie na costa da Colômbia (VELASCO et al., 2010). Na região Sul do Brasil, *C. rhizophorae* apresenta uma maior porcentagem de indivíduos sexualmente maduros nos meses mais quentes do ano e de indivíduos com gônadas vazias e/ou parcialmente vazias nos períodos de águas mais frias (CHRISTO; ABSHER, 2006). Ainda assim, não há um período de repouso reprodutivo total, visto que ocorre a eliminação de gametas e a presença de larvas ao longo de todo o ano (CHRISTO, 2006).

Para a espécie *C. gasar*, o ciclo reprodutivo difere ao longo da costa do Brasil, dependendo da sazonalidade e das variáveis ambientais na qualidade da água. Na região norte, a predominância de indivíduos sexualmente maduros está relacionada ao período de maior pluviosidade (e menor salinidade da água) e à época de transição com o período de seca (PAIXÃO et al., 2013). Na região sudeste, o período reprodutivo é intermitente, com um pico de maturidade sexual na primavera, entre os meses de outubro e novembro (AKABOSHI e PEREIRA, 1981; GALVÃO et al., 2000). O recrutamento das larvas ocorre em maior número nas estações de primavera-verão e verão-outono, e está relacionado ao aumento da temperatura e à redução da salinidade (AKABOSHI; PEREIRA, 1981; NALESSO et al., 2008). Na região sul,

o número de indivíduos maduros aumenta no final da primavera (MONTANHINI NETO et al., 2012) até um máximo no verão, quando há maior predominância de fêmeas aptas à liberação de gametas (CHRISTO; ABSHER, 2006; GOMES et al., 2014). As maiores concentrações de larvas e as maiores taxas de captação de sementes são registradas no verão, coincidindo com o pico de maturidade sexual (MONTANHINI NETO et al., 2012). A temperatura, o oxigênio dissolvido e a transparência da água foram os fatores ambientais que mais influenciaram no ciclo reprodutivo da espécie nesta região (MONTANHINI NETO et al., 2012; GOMES et al., 2014).

1.2.5 Produção de sementes de ostras em laboratório

O avanço no conhecimento sobre a reprodução das espécies de moluscos bivalves e sobre as técnicas de cultivo larval nas décadas de 60 e 70 permitiu a implantação de laboratórios de maturação e larvicultura (“hatcheries”), o controle do desenvolvimento larval e a produção regular de um grande número de sementes de qualidade, aptas para engorda, nos períodos ideais de cultivo (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004).

Em ostras, recentes tecnologias desenvolvidas incluem sementes triploides e programas de seleção reprodutiva, direcionados à produção de sementes de alta qualidade, com crescimento rápido e adaptadas a condições ambientais específicas. No gênero *Crassostrea*, programas de seleção restringem-se às espécies *C. gigas* e *C. virginica* (BOUDRY et al., 2004).

Para *C. gigas*, a maturação sexual é controlada pela qualidade da alimentação (UTTING; MILLICAN, 1997), pela temperatura e pelo foto-período (FABIOUX et al., 2005). O condicionamento de animais pode ocorrer ao longo do ano, em temperaturas entre 8 e 11°C, para a produção de sementes quando desejável (FAO, 2005-2015).

O método de indução à desova comumente usado é a raspagem do tecido gonádico (“strip”) de machos e fêmeas sexualmente maduros em separado e depois a fecundação direta da solução de oócitos com a solução de esperma (GOSLING, 2003). Neste método, oócitos de 6 ou mais fêmeas são fecundados com pequenas amostras de espermatozoides de um número similar de machos (HELM; MILLICAN, 1977; FAO, 2005-2015). A desova em massa é também uma técnica usada, que envolve a liberação simultânea de gametas de

vários indivíduos em um único tanque, induzida por meio do aumento da temperatura (UTTING; SPENCER, 1991).

De acordo com a revisão da FAO (2005-2015), o desenvolvimento embrionário de *C. gigas* até o estágio de larva-D dura aproximadamente 24 h e ocorre em tanques com grande volume de água marinha filtrada, em temperaturas de 25 a 28°C e salinidades de 25 a 32, sem fornecimento de ar ou alimento. As larvas são cultivadas em sistema estático ou de fluxo contínuo de água com alimento, ao longo do estágio pelágico que dura de 14 a 18 dias, em temperaturas de 25 a 28°C de temperatura e salinidade de 20 a 25. A densidade inicial varia de 20.000 larvas.L⁻¹ no sistema estático a mais de 100.000 larvas.L⁻¹ no sistema contínuo e é reduzida ao longo da larvicultura, por meio da mortalidade natural e do processo seletivo de peneiramento que ocorre nas trocas de água e no manejo dos tanques (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004). O objetivo da produção é selecionar somente as larvas saudáveis e de crescimento rápido para reduzir as taxas de mortalidade e a duração da fase de assentamento (LOOSANOFF; DAVIS, 1963).

A alimentação na larvicultura é baseada na dieta diária com microalgas cultivadas, de espécies flageladas dos gêneros *Isochrysis* (Parke, 1949) e/ou *Pavlova* (Butcher, 1952) e diatomáceas dos gêneros *Chaetoceros* (Ehrenberg, 1844) e/ou *Thalassiosira* (Cleve, 1873), cuja composição e concentração variam ao longo do desenvolvimento larval. Esta dieta pode ser suplementada com uma ou mais espécies de flagelados verdes do gênero *Tetraselmis* (Stein, 1878), quando as larvas estão próximas ao assentamento (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004).

Em muitas regiões do mundo, as “hatcheries” fazem o assentamento e o crescimento das sementes até 3 a 5 mm de tamanho em condições controladas. O início do assentamento pode ser previamente estimulado por meio de métodos físicos (refrigeração das larvas) e/ou químicos (larvas em solução de neurotransmissor, como L-DOPA ou epinefrina) (FAO, 2005-2015). Essa fase de produção é geralmente realizada em sistemas de tanques de grande volume com renovação parcial da água diariamente, onde as sementes são mantidas em recipientes com recirculação de água por injeção de ar comprimido (sistema “upwelling”) (SPENCER; UTTING, 1991; HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004). Dietas com microalgas de alto valor nutricional são fornecidas para promover o crescimento rápido das sementes até a sua transferência para sistemas de berçários e engorda no mar ou venda aos produtores (FAO, 2005-2015).

A técnica de assentamento remoto também é amplamente utilizada para reduzir os custos de produção de *C. gigas*. Os produtores, ao invés de comprarem sementes de ostras, adquirem as larvas pediveliger olhadas e induzem o assentamento diretamente em suas instalações de cultivo. A fixação das larvas olhadas pode ser feita em conchas ou materiais plásticos acondicionados em bolsas confeccionadas com redes. As sementes fixadas são levadas diretamente para o local de cultivo e ali completam o seu crescimento (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004).

No Brasil, a produção programada de sementes de *C. gigas* é realizada no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC), a partir de um setor de condicionamento e maturação de reprodutores que são mantidos em sistema de fluxo contínuo de água do mar e alimento, com controle de temperatura de 14°C a 23°C, permitindo o estoque de gametas por um período de até seis meses. Neste sistema, pode-se obter até 2×10^6 ovócitos para cada indução à desova (300.000 a 400.000 oócitos por fêmea), produzindo até 30 milhões de sementes de 1 mm. A manutenção destas sementes em um sistema de caixas flutuantes no mar possibilitou uma redução de 50% nos custos, em comparação ao sistema “upwelling” de produção de sementes maiores que 4 mm (FERREIRA et al., 2011).

A produção regular de sementes de ostras nativas não está totalmente estabelecida. O LMM-UFSC vem, ao longo dos anos, desenvolvendo pesquisas em intercâmbio com outras instituições para consolidar um sistema de produção adaptado às espécies nativas, principalmente *C. gasar*, cujos adultos e formas jovens apresentam tamanho superior a *C. rhizophorae* (CHRISTO; ABSHER, 2006; CHRISTO; ABSHER, 2008).

A reprodução em laboratório de *C. rhizophorae* e *C. gasar* é realizada a partir de animais retirados diretamente do mar, sem um programa sistematizado de condicionamento e maturação de gametas em laboratório. Segundo descrito em Silveira et al. (2011), a desova em massa (350 a 400 animais sem sexo determinado) é induzida em etapas que envolvem estímulos físicos (fluxo de água, choque de temperatura e exposição ao ar em uma calha de 400 L) e uma estimulação biológica (adição de extratos de gametas sexualmente maduros em um tanque de larvicultura de grande volume). O desenvolvimento embrionário ocorre em 24 h e as larvas são cultivadas em sistema estático, em tanques de 6.000 ou 15.000 L, com salinidade de 27, temperatura inicial de 25°C e densidade inicial de 5.000 a 20.000 larvas.L⁻¹. A larvicultura tem

duração entre 18 e 30 dias e as sementes são produzidas em sistema “upwelling” até 3 mm de tamanho.

1.2.6 Pesquisas aplicadas ao sucesso da reprodução de ostras em laboratório

Segundo Gjedrem (2005), programas de domesticação na aquicultura são numericamente limitados, em razão da complexidade do ciclo reprodutivo das espécies que não é totalmente conhecido e, conseqüentemente, não pode ser controlado no ambiente de cultivo. Isto se aplica às espécies de ostras nativas brasileiras, cujo conhecimento disponível ainda não permite estabelecer uma produção sustentável de sementes em laboratório.

Gjedrem (2005) ressalta ainda que, em espécies aquícolas, a domesticação torna-se ainda mais difícil, devido às altas taxas de fecundidade e de mortalidade na fase de vida larval. Estas características da estratégia de vida destas espécies podem resultar em uma grande variação no sucesso reprodutivo entre indivíduos que podem contribuir diferencialmente para a maturação de gametas, fecundação, desenvolvimento larval, assentamento e crescimento (HEDGECOCK, 1994).

A qualidade gamética é definida como o potencial dos gametas em produzir uma prole viável que pode ser quantificada em termos de taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário (SONG et al., 2009). Além disso, outros fatores influenciam o sucesso reprodutivo de ostras cultivadas, como interações oócito-esperma, viabilidade diferencial entre genótipos e seleção (LANNAN, 1980; LANNAN et al., 1980; GAFFNEY et al., 1993; BOUDRY et al., 2002; BUSHEK et al., 2008; HEDGECOCK; PUDOVKIN, 2011).

Em ostras do gênero *Crassostrea*, os trabalhos publicados nesta área do conhecimento tem sido direcionados à *C. virginica* e, principalmente, à *C. gigas*, uma das espécies aquícolas mais importantes economicamente. Pesquisas aplicadas ao desenvolvimento do cultivo em laboratório de *C. gigas* desde a década de 80 contribuíram para o estabelecimento de programas de cruzamentos (HEDGECOCK; DAVIS, 2007) e de seleção reprodutiva (WARD et al., 2000; LANGDON et al., 2003; DÉGREMONT et al., 2007; KONG et al., 2015). Mesmo assim, o sucesso reprodutivo de *C. gigas* é ainda altamente variável (BOULAIS et al., 2015).

Lannan (1980), a partir de cruzamentos fatoriais 2 x 2, inferiu que

a variação na sobrevivência de larvas de *C. gigas* em sistema de “hatchery” é explicada por componentes genéticos e ambientais. Segundo este autor, determinadas combinações entre machos e fêmeas influenciaram significativamente a sobrevivência larval e resultaram de uma regulação genética na gametogênese. Assim, para um determinado ambiente de cultivo, a sobrevivência máxima ocorreu a partir de cruzamentos entre indivíduos que expressaram a condição ótima de desenvolvimento gonádico.

Lanan et al. (1980) descobriram que a desova e a fecundação que parecem ser normais nem sempre resultam em sobrevivência larval e assentamento satisfatórios. Confirmaram ainda que os oócitos que fornecem o maior sucesso de assentamento são aqueles produzidos em um intervalo de condicionamento ótimo durante a gametogênese; oócitos liberados antes ou após este período tiveram menor probabilidade de produzir larvas que sobreviveram, desenvolveram-se, assentaram e metamorfosearam. Estudos subsequentes (MURANAKA; LANAN, 1984; UTTING; MILLICAN, 1997) evidenciaram que o alimento em quantidade e qualidade adequadas melhora a qualidade dos gametas durante o condicionamento de reprodutores de ostras, aumentando as taxas de desenvolvimento embrionário.

Helm e Millican (1977) demonstraram que o desenvolvimento larval de *C. gigas* é grandemente retardado se a fecundação de oócitos for atrasada por mais de 90 min e que concentrações de até 100.000 oócitos.L⁻¹ permitem 80% ou mais de larvas-D bem desenvolvidas. Stephano e Gould (1988) observaram que oócitos mantidos por um período de 105 min não deterioram e produzem mais de 85% de larvas normais, usando razões de até 1.000 espermatozoides por oócito. Estes autores recomendaram que os oócitos sejam deixados em repouso por uma hora antes da fecundação, pois este tratamento reduz a incidência de poliespermia para menos de 7%.

Gaffney et al. (1993) demonstraram, a partir de cruzamentos 2 x 2 dentro e entre populações de *C. virginica*, a existência de uma incompatibilidade gamética moderada e efeitos de interação oócito-esperma sobre a viabilidade de larvas, com taxas de fecundação mais reduzidas nos cruzamentos entre populações. Bushek et al. (2008) confirmaram que os gametas desta espécie permanecem viáveis por 4 a 6 h, com taxas de fecundação acima de 50%, as quais decaíram com o decréscimo da densidade de espermatozoides e a competição entre gametas.

Para *C. gigas*, Suquet et al. (2009) desenvolveram um protocolo de anestesia com Cloreto de Magnésio (MgCl₂) que tem servido para o

monitoramento da qualidade de gametas de *C. gigas* em laboratório, em conjunto com outros protocolos estabelecidos, como de incubação (SUQUET et al., 2007) e fecundação (SONG et al., 2009) de oócitos. Este protocolo pode ser usado em um mesmo grupo de animais, em meses consecutivos, com taxas de mortalidade quase nulas. O fato de evitar o sacrifício de animais é particularmente valioso, uma vez que permite a condução de experimentos que podem monitorar a condição de um mesmo estoque e direcionar as estratégias de reprodução (SUQUET et al., 2009; 2010). Além disso, Corporeau et al. (2012) e Boulais et al. (2015) conduziram estudos sobre a qualidade bioquímica de oócitos e larvas trocóforas, aumentando o conhecimento sobre os fatores proteicos e os processos proteômicos envolvidos na competência de desenvolvimento desta espécie.

Para as espécies de ostras nativas cultivadas no Brasil, estudos sobre maturação de gametas e desenvolvimento de formas jovens vem sendo realizados para entender as variáveis ambientais e os processos biológicos envolvidos na produção em laboratório. Porém, não existem informações nem protocolos definidos sobre a capacidade de gametas maturados em condições controladas de desenvolver larvas que sejam capazes de produzir sementes (GOMES et al., 2014).

Para *C. rhizophorae*, Santos e Nascimento (1985) observaram que o desenvolvimento embrionário foi alcançado em 24 h, em faixas de salinidade entre 25 e 37 e de temperatura entre 25°C e 30°C. Estes autores demonstraram que, dentro de 45 min após a coleta de esperma, 50% dos oócitos foram fecundados e produziram larvas-D normais; após 60, 90 e 120 min, a taxa de fecundação diminuiu para 35%, 25% e 16%, respectivamente. Determinaram ainda que concentrações de 10.000 a 40.000 oócitos.L⁻¹ são melhores para a produção de lavas-D e que a poliespermia deletéria pode ser evitada mantendo concentrações de esperma de 500 a 5.000 por oócito, em salinidade de 25 e temperatura de 25°C.

Miranda e Gusenski (1999) verificaram que as melhores taxas de crescimento larval são obtidas em temperatura de 25°C e densidades entre 5.000 e 15.000 larvas.L⁻¹, e que a sobrevivência diminui em temperaturas altas (30°C) e em salinidades baixas (< 20). A faixa ótima de salinidade para o crescimento de larvas de *C. rhizophorae* foi entre 20 e 30 (LEMOS et al., 1994; MIRANDA; GUSENSKI, 1999) e para o crescimento de sementes entre 15 e 25 (GUIMARÃES et al., 2008).

Na espécie *C. gasar*, a maturação sexual foi relacionada com o aumento da temperatura (RAMOS et al., 2014) e também com a redução da salinidade (GOMES et al., 2014). A taxa de fecundação de oócitos

diminui progressivamente após 30 min da coleta de gametas, devido à perda da mobilidade dos espermatozoides (TURECK, 2010). O desenvolvimento embrionário, o crescimento e a sobrevivência de larvas apresentaram melhores resultados na salinidade de 28 (LEGAT, 2015). As taxas de assentamento de larvas e recuperação de sementes foram maiores usando coletores plásticos e pó de concha para induzir a metamorfose dentro das unidades de cultivo, em comparação às taxas de assentamento de larvas tratadas com o composto epinefrina ($C_9H_{13}NO_3$ $C_4H_6O_6$) (SILVEIRA et al., 2011). Por ser a prática comum adotada no LMM-UFSC, o assentamento de larvas após tratamento com epinefrina foi avaliado em diferentes temperaturas e salinidades, resultando em melhores taxas de recuperação na salinidade de 20 e na temperatura de 27°C (AREIAS, 2012).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Contribuir com conhecimentos sobre a reprodução em laboratório de espécies de ostras do gênero *Crassostrea* cultivadas no Brasil.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar um método de anestesia que permita amostrar o tecido gonádico e determinar o sexo das espécies de ostras do gênero *Crassostrea* sem o sacrifício de animais;
- Avaliar o sucesso de cruzamentos entre as espécies *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar*;
- Identificar possíveis híbridos interespecíficos, por meio de marcadores de DNA mitocondrial e nuclear.

CAPÍTULO I.
ANESTESIA EM OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea*
CULTIVADAS NO BRASIL

O artigo foi submetido e aceito para publicação no periódico *Boletim do Instituto de Pesca*, sendo redigido segundo as normas da referida revista científica.

ANESTESIA EM OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* CULTIVADAS NO BRASIL

Angela PUCHNICK-LEGAT^{1,2}; Jefferson Francisco Alves LEGAT^{1,2};
Carlos Henrique Araújo de Miranda GOMES²; Simone SUHNEL^{2,3};
Claudio Manoel Rodrigues de MELO²

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio-Norte, Grupo de Pesquisa em Aquicultura e Pesca, BR 343, km 35, Caixa Postal 341, CEP: 64200-970, Parnaíba, PI, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Moluscos Marinhos, Rua dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, CEP: 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.

³Universidade Estadual de Santa Catarina, Rua Coronel Fernandes Martins, 270, Progresso, CEP: 88790-000, Laguna, SC, Brasil - SC

E-mail para correspondência: angela.legat@embrapa.br

RESUMO

Este estudo avaliou: o tempo necessário para indução à anestesia e recuperação de ostras *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas*, utilizando o sal cloreto de magnésio ($MgCl_2$); a sobrevivência dos animais após anestesia e amostragem de tecido gonádico; e a geração de larvas-D após anestesia. Para cada espécie, três grupos de 10 animais foram mantidos em 50 gL^{-1} de $MgCl_2$, salinidade de 36, temperatura de 22°C e aeração constante. Um grupo controle foi mantido em solução sem $MgCl_2$. A cada 1h, ostras anestesiadas foram registradas, amostradas para determinar o sexo e colocadas em água do mar limpa para avaliar sua recuperação a cada 30 min. As amostragens das gônadas foram feitas ao lado do músculo adutor posterior, usando seringas de 1 mL e agulha de 0,60x25 mm. Cruzamentos fatoriais foram gerados dentro e entre grupos de ostras anestesiadas e não anestesiadas para produzir larvas-D em *C. gigas*. A sobrevivência após 10 dias de anestesia foi de 100% para as três espécies. Para *C. rhizophorae* e *C. gigas*, 100% dos animais foram anestesiados após 360 min e recuperados após 240 e 150 min, respectivamente. Para *C. gasar*, 87% foram anestesiados após 720 min e recuperados após 240 min. Não houve diferença significativa no número de larvas-D entre os

cruzamentos. O $MgCl_2$ serviu como relaxante muscular eficiente e permitiu determinar o sexo nas três espécies de ostras estudadas. Não foram verificados efeitos deletérios sobre a sobrevivência das três espécies ou na geração de larvas-D de *C. gigas*.

Palavras-chave: anestésicos, cloreto de magnésio, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea gigas*, larva D.

ANESTHESIA IN OYSTERS OF THE GENUS *Crassostrea* CULTURED IN BRAZIL

ABSTRACT

This study evaluated: 1) the time required for anesthesia induction and recovery of oysters *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea gasar* and *Crassostrea gigas* using magnesium chloride ($MgCl_2$); 2) the survival after anesthesia and gonad sampling; and 3) the D-larvae generation after anesthesia. For each species, three groups of 10 animals were kept in $50 \text{ g.L}^{-1} MgCl_2$, salinity of 36 and temperature of 22°C . One control group was kept in solution without $MgCl_2$. Every 1h anaesthetized oysters were recorded, sampled to determine sex and placed in clean seawater to assess recovering every 30 min. Gonad samplings were made on the left side, above the adductor muscle, using 1 mL syringes and needles (0,60 x 25 mm). Factorial crosses were generated within and between anaesthetized and non-anesthetized oyster groups to produce D-larvae in *C. gigas*. The survival after 10 days of anesthesia was 100% for the three studied species. For *C. rhizophorae* and *C. gigas*, 100 % of the animals were anesthetized after 360 min and were recovered after 240 e 150 min, respectively. For *C. gasar*, 87 % were anesthetized after 720 min and recovered after >240 min. There were no significant differences in D-larvae numbers between factorial crosses. The salt $MgCl_2$ served as an efficient relaxant and cause no deleterious effect on the survival of the three studied species, or on the D-larvae generation in *C. gigas*.

Keywords: anaesthetics, magnesium chloride, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea gigas*, D-larvae.

INTRODUÇÃO

A produção de ostras cultivadas no Brasil é relativamente pequena (3.670 mil toneladas; BRASIL, 2013) em comparação a outras

regiões do mundo, como China (3,68 milhões de toneladas, Japão (261 mil toneladas), Coreia (238 mil toneladas) e França (115 mil toneladas) (FAO, 2005-2015). Entretanto, a ostreicultura constitui uma fonte de renda para populações litorâneas que dependem dos recursos pesqueiros para a sua sobrevivência. A espécie mais importante economicamente é a ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), que representa cerca de 90% da produção total de ostras cultivadas (BRASIL, 2013; EPAGRI, 2014). O cultivo de *C. gigas* está concentrado no Estado de Santa Catarina, principalmente nas Baías Norte e Sul de Florianópolis (27°69'S; 48°57'W) (MELO *et al.*, 2010) e vem se expandindo ao longo dos anos, com um aumento de 43 t em 1991 para 2.932 t em 2013 (EPAGRI, 2014).

Apesar do potencial de *C. gigas* para crescimento rápido, a sua baixa tolerância a temperaturas mais quentes (POLI, 2004) limita, no momento, as áreas de cultivo às regiões Sudeste e Sul do Brasil. Portanto, para fortalecer a ostreicultura em território nacional, é necessário direcionar esforços de pesquisa e adaptar tecnologias para a otimização da produção das espécies de ostras nativas, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), principalmente nas regiões tropicais do Norte e Nordeste do país.

A produção em laboratório (“hatcheries”) é o método mais efetivo para a obtenção de sementes de ostras, com um mínimo de impacto sobre as populações naturais, desde que não seja possível a captura de larvas e sementes em coletores no ambiente (FERREIRA; NETO, 2007). No Sul do Brasil, a produção de sementes de ostras em “hatcheries” é realizada pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, em menor escala, pelo Laboratório “Blue Water Aquaculture”.

Em “hatcheries”, animais sexualmente maduros podem ser induzidos à desova em massa por meio de choque térmico e exposição ao ar (SILVEIRA *et al.*, 2011), ou podem ser abertos e ter seus gametas raspados (“strip”) do tecido gonádico para a fecundação direta na água (FAO, 2005-2015). Em ambos os casos, no LMM-UFSC, antes de cada evento de desova, amostras de tecido de até 40 reprodutores são retiradas para a determinação do sexo e da qualidade dos gametas. O número de reprodutores abertos e amostrados pode ser ainda maior quando as condições de desenvolvimento gonádico não são ideais e quando é preciso igualar a razão entre machos e fêmeas para a fecundação (C.M.R. Melo, comunicação pessoal).

A biópsia de tecidos em ostras sem sedação geralmente envolve procedimentos letais, visto que a concha deve ser removida para se obter

amostras. Na ostreicultura, evitar o sacrifício dos animais é particularmente valioso para fins comerciais e de pesquisa, à medida que permite conduzir experimentos para estabelecer melhores estratégias de seleção de reprodutores (SUQUET *et al.*, 2009). Técnicas de anestesia tem sido empregadas com sucesso para minimizar o estresse no manuseio de animais e reduzir as mortalidades relacionadas à pesquisa (BUTT *et al.*, 2008) e também para facilitar biópsias de tecido e estudos de gametogênese individual (SUQUET *et al.*, 2010).

Os relaxantes musculares benzocaína e propileno fenoxetol tem sido usados como anestésicos efetivos durante o processo cirúrgico para a produção de pérola nas espécies *Pinctada albina* (Lamarck, 1819), *Pinctada máxima* (Jameson, 1901), *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) e *Pinctada fucata* (Gould, 1850) (NORTON *et al.*, 1996; ACOSTA-SALMÓN *et al.*, 2005; MAMANGKEY *et al.*, 2009). No entanto, estes relaxantes químicos provaram ser inadequados para uso em outras espécies, como *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) (ACOSTA-SALMÓN; DAVIS, 2007) e *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) (BUTT *et al.*, 2008).

O cloreto de magnésio ($MgCl_2$) constitui-se em um relaxante eficiente, não-tóxico e facilmente administrável a espécies de moluscos (ACOSTA-SALMÓN; DAVIS, 2007). Este vem sendo usado com sucesso nas espécies de ostras *S. glomerata* (BUTT *et al.*, 2008), *C. gigas* (SUQUET *et al.*, 2009), *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) (SUQUET *et al.*, 2010) e *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845) (ALIPIA *et al.*, 2014). Para *C. gigas* e *O. edulis*, SUQUET *et al.* (2009, 2010), respectivamente, desenvolveram um protocolo confiável de anestesia e amostragem de tecido gonádico para determinação sexual, o qual foi validado em uma mesma amostra de animais, anestesiados e amostrados mensalmente durante três meses consecutivos, resultando em baixas taxas de mortalidade.

Não existem estudos sobre anestesia em ostras do gênero *Crassostrea* cultivadas no Brasil. O desenvolvimento de um método não-destrutivo direcionado ao manejo de reprodutores permitiria amostragens sucessivas dos mesmos animais e estudos descritivos de gametogênese individual, visando ao estabelecimento de um futuro programa de seleção reprodutiva. O protocolo-modelo descrito para *C. gigas* (SUQUET *et al.*, 2009) deve ser avaliado quanto à necessidade de adaptações para as espécies nativas, *C. rhizophorae* e *C. gasar*, e para as características operacionais do laboratório de produção. Além disso, é necessário investigar os efeitos da anestesia sobre o sucesso de fecundação e formação de larvas-D destas espécies. Neste sentido, este

estudo avaliou o tempo requerido para a anestesia, usando $MgCl_2$ (50 $g.L^{-1}$), e para a recuperação de *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* (espécie controle), a sobrevivência após anestesia e amostragem do tecido gonádico, e a fecundação e o desenvolvimento de larvas-D a partir de animais anestesiados.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado na Barra da Lagoa Florianópolis, SC. Animais adultos de *C. rhizophorae* ($48,6 \pm 7,1$ mm; $20,0 \pm 5,0$ g), *C. gasar* ($70,7 \pm 22,9$ mm; $46,3 \pm 5,0$ g) e *C. gigas* ($114,0 \pm 16,4$ mm; $167,7 \pm 41,0$ g) foram coletados na área de cultivo experimental, na praia de Sambaqui ($27^{\circ}35'S$ e $48^{\circ}32'W$), Florianópolis e transportados ao LMM-UFSC. Os exemplares foram colocados em tanques de condicionamento (500 L), separados por espécie, e mantidos em sistema de fluxo contínuo de água, em constante aeração, temperatura ($23^{\circ}C$) e salinidade (36), até os experimentos subsequentes de anestesia. Durante o período de manutenção, os animais foram alimentados com a microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898), em uma concentração final de 20 a 40×10^4 $cell.mL^{-1}$, em sistema contínuo.

Dois experimentos foram realizados neste estudo. O Experimento I, desenvolvido com *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas*, determinou o tempo para anestesia e recuperação e a sobrevivência de animais anestesiados e amostrados em seu tecido gonádico. O Experimento II foi desenvolvido apenas com *C. gigas* e avaliou o efeito da anestesia sobre o número resultante de larvas-D formadas após 24h da fecundação. Não foi possível realizar este experimento para as espécies de ostras nativas porque, após a determinação sexual, não houve disponibilidade de fêmeas de *C. gasar* e machos de *C. rhizophorae* para os cruzamentos.

Experimento I

Exemplares de cada espécie ($n=40$) foram retirados aleatoriamente dos tanques de 500 L e colocados sob condições de jejum alimentar por 12h (overnight), em recipientes de 30 L contendo água marinha filtrada com constante aeração, temperatura ($22^{\circ}C$) e salinidade (36) antes do experimento de indução à anestesia. A altura e o peso úmido de cada ostra foram registrados.

Após este período, três grupos de 10 animais de cada espécie

foram anestesiados em recipientes de 10 L, contendo uma solução de 50 g.L⁻¹ (525 mM) de Cloreto de magnésio (MgCl₂) e água, conforme os procedimentos descritos em SUQUET *et al.* (2009). Para evitar o aumento da salinidade pela adição de MgCl₂, o meio de diluição foi 6 L de água doce e 4 L de água marinha. Um grupo controle de 10 animais de cada espécie foi colocado em um recipiente de 10 L contendo água marinha sem MgCl₂, nas mesmas condições do dia anterior.

A aeração foi mantida constante em todos os grupos e a salinidade e a temperatura foram monitoradas ao longo do experimento que teve duração de 6h. A cada 1 h (60, 120, 180, 240, 300, 360 min), foi contado o número de ostras anestesiadas e não anestesiadas por réplica. Os animais foram considerados anestesiados quando permaneceram com as suas valvas abertas após sucessivas pressões exercidas na concha. As ostras que não foram anestesiadas após 360 min (6 h) foram mantidas por mais 360 min na solução de MgCl₂ para avaliação final.

As ostras anestesiadas foram separadas em dois grupos. Um grupo (R) foi transferido diretamente para recuperação, em recipientes separados por espécie [*C. rhizophorae* (Rrh; n=15); *C. gasar* (Rga; n=16); e *C. gigas* (Rgi; n=10)]. O outro grupo (S) foi amostrado para determinação do sexo por espécie [*C. rhizophorae* (ASrh; n=15); *C. gasar* (ASga; n=14); e *C. gigas* (ASgi; n=20)] e depois transferido para recuperação.

A amostragem do tecido gonádico foi realizada ao lado do músculo adutor posterior dos animais anestesiados, usando uma seringa de 1 mL com uma agulha de 0,60 x 25 mm (23 gauge) para cada indivíduo (SUQUET *et al.*, 2009). Cada amostra de tecido (aproximadamente 0,05 mL) foi puxada com a seringa e colocada em uma lâmina de vidro e o sexo foi determinado usando um microscópio ótico binocular com amplificação de 40x e 100x.

A recuperação da anestesia foi monitorada a cada 30 min, por réplica de animais e por espécie, em recipientes de 10 L contendo água marinha filtrada e esterilizada, com aeração, temperatura (22°C) e salinidade (36) constantes. As ostras foram consideradas recuperadas quando retomaram a habilidade de fechar as valvas imediatamente após o seu manuseio.

Após a recuperação, os grupos controles e os grupos de animais induzidos foram identificados e dispostos nos tanques de condicionamento para o registro da sobrevivência durante 10 dias. A sobrevivência foi comparada dentro de cada espécie e entre três diferentes grupos: 1) ostras anestesiadas e amostradas (grupo S); 2)

ostras anestesiadas e não-amostradas (grupo R); e 3) ostras não-anestesiadas e não-amostradas (grupo controle).

Experimento II

O efeito da anestesia sobre a atividade reprodutiva de *C. gigas* foi avaliada a partir de 55 exemplares retirados, aleatoriamente, dos tanques de condicionamento e separados em dois grupos distintos: um grupo controle de ostras não-anestesiadas (n=25) e um outro grupo submetido ao tratamento anestésico (n=30). Os procedimentos de anestesia e amostragem do tecido gonádico foram os mesmos acima descritos. O tempo de anestesia foi fixado em 180 min.

Após a determinação do sexo, um conjunto de quatro fêmeas e quatro machos maduros foram selecionados do grupo controle (C) e do grupo de ostras anestesiadas (A). Fêmeas e machos foram avaliados em microscópio ótico (40x e 100x), respectivamente, com base no número, forma e tamanho de oócitos e no número e motilidade de espermatozoides. As fêmeas selecionadas apresentaram um alto número de oócitos grandes e mais arredondados e os machos selecionados, um alto número de espermatozoides móveis.

A obtenção de gametas foi realizada com o sacrifício dos animais por meio da raspagem do tecido gonádico (“strip”). Após o “strip” de cada conjunto separado de fêmeas (A e C), os oócitos foram hidratados por 1 h, em recipientes de 10 L contendo água marinha filtrada a 1 μ m e esterilizada por luz ultravioleta (UV), com salinidade de 36 e temperatura de 25°C. Para a quantificação dos oócitos hidratados, três amostras de 0,2 mL de cada solução foram diluídas em três provetas de 5 mL contendo água marinha e depois três amostras de 0,2 mL foram coletadas em câmaras de “Sedgewick-Rafter” e visualizadas em microscópio ótico com amplificação de 40x. Em seguida, cada solução foi dividida em seis partes iguais com concentração de 150 oócitos.mL⁻¹.

Volumes de 30 mL de solução de espermatozoides (A ou C) foram adicionados a cada 20 min por 1 h, para induzir a fecundação dos oócitos (A ou C). Desta forma, cruzamentos fatoriais 2 x 2 foram gerados dentro e entre ostras anestesiadas (A) e não-anestesiadas (C), produzindo quatro grupos em triplicatas: fêmeas A x machos A; fêmeas A x machos C; fêmeas C x machos A; e fêmeas C x machos C. Após 24 h, três amostras de 0,5 mL de cada réplica dentro de cada cruzamento foram retiradas e colocadas em câmaras de “Sedgewick-Rafter” para a quantificação de larvas-D.

Análise Estatística

O tempo para anestesia e recuperação dos animais, a sobrevivência e o número de larvas-D foram analisados por meio de ANOVA e teste de Tukey, usando o pacote computacional SAS[®], após verificação quanto à normalidade dos erros e à homogeneidade das variâncias. O efeito do peso, da altura e do sexo dos animais sobre o tempo para anestesia e recuperação foram analisados usando Correlação de Pearson e teste- *t*.

RESULTADOS

Experimento I

A salinidade (36) e a temperatura da água (22°C) permaneceram constantes durante todo o período experimental (tempo total de indução: 720 min). Após 120 min de exposição ao MgCl₂, 96,7 ± 4,7% dos exemplares de *C. rhizophorae*, 93,3 ± 4,7% de *C. gigas* e 83,3 ± 17,0% de *C. gasar* foram anestesiados (Figura 1). Após 360 min, 100% das ostras *C. rhizophorae* e *C. gigas* foram induzidas ao relaxamento muscular, mas 13,3 ± 12,5% das ostras *C. gasar* não foram anestesiadas. Mesmo depois de 360 min adicionais, este percentual de ostras *C. gasar* não respondeu à anestesia e permaneceu com as valvas fechadas.

O tempo requerido para a recuperação dos animais anestesiados (Figura 2) foi maior em *C. rhizophorae* (240 min) e em *C. gasar* (>240 min), e estatisticamente diferente ($p < 0,0001$) comparado ao tempo em *C. gigas* (150 min). Após 60 min, 96,7 ± 4,7% das ostras *C. gigas* fecharam suas valvas espontaneamente, em comparação com apenas 7,0 ± 5,0% de *C. gasar* e nenhum indivíduo (0%) de *C. rhizophorae*. Após 150 min, quando 100 % das ostras *C. gigas* tinham se recuperado, 38% de *C. gasar* e aproximadamente 13% de *C. rhizophorae* ainda estavam anestesiadas.

O peso úmido e a altura dos animais não tiveram influência sobre a eficiência de anestesia e recuperação para as três espécies estudadas. Ambos os animais menores e maiores requereram o mesmo tempo para serem anestesiados e se recuperarem. Os valores mínimos e máximos de peso e altura para *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* são apresentados na Tabela 1.

Os procedimentos usados para a amostragem do tecido gonádico permitiram identificar fêmeas, machos e animais com sexo indeterminado nas três espécies de ostras (Tabela 2). Não houve

diferença significativa em relação ao sexo e o tempo para a anestesia dos animais amostrados (grupo S) de cada espécie. Apenas um macho de *C. gigas* não foi anestesiado após 120 min de indução. Em relação ao tempo para recuperação após a anestesia e a biópsia de tecido, as fêmeas de *C. gigas* (Figura 3C) e de *C. rhizophorae* (Figura 3B) requereram mais tempo para se recuperarem do que os machos. Todavia, os números amostrais de fêmeas *C. gigas* e machos *C. rhizophorae* foram muito pequenos para indicar diferenças estatísticas ao nível de significância de 0,05. Para *C. gasar*, não houve padrão de diferenciação por sexo durante o tempo de recuperação (Figura 3A).

Após 10 dias da exposição ao relaxante $MgCl_2$ e das biópsias de tecido, não foi observada mortalidade nos grupos de animais anestesiados e amostrados (S), anestesiados e não amostrados (R) e nos grupos controles das três espécies estudadas.

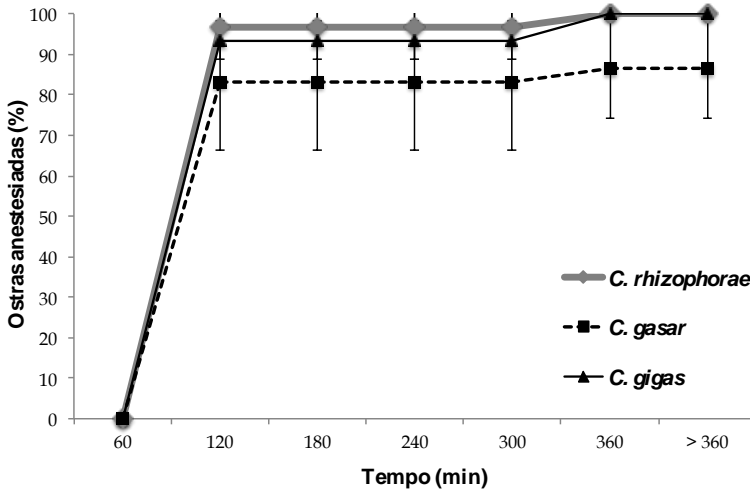


Figura 1. Porcentagens cumulativas de ostras anestesiadas *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* após exposição ao $MgCl_2$. O tempo indica a duração da exposição antes do relaxamento dos animais. As porcentagens foram calculadas em incrementos de 60 min até 360 min (6 h) após a exposição inicial. As barras mostram os desvios-padrão.

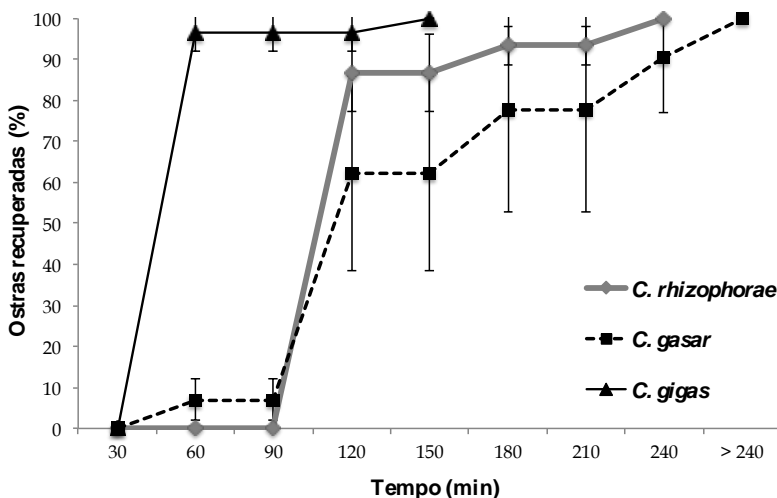


Figura 2. Porcentagens cumulativas de ostras recuperadas *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* após exposição ao $MgCl_2$. As porcentagens foram calculadas em incrementos de 30 min até 240 min (4 h) após a recuperação inicial. As barras indicam os desvios-padrão.

Tabela 1. Valores mínimos e máximos de peso úmido e altura de ostras anestesiadas, para as três espécies do gênero *Crassostrea* estudadas (*C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas*).

Espécie	Altura (mm)		Peso úmido (g)	
	Mínima	Máxima	Mínimo	Máximo
<i>C. rhizophorae</i>	33,00	66,00	10,36	33,32
<i>C. gasar</i>	45,00	132,00	35,36	55,05
<i>C. gigas</i>	93,00	155,00	106,58	299,92

Tabela 2. Machos (M), fêmeas (F) e animais indeterminados (I) identificados a partir da amostragem do tecido gonádico de ostras anestesiadas, usando seringas e agulhas (Experimento I).

Espécie	Machos (%)	Fêmeas (%)	Indeterminados (%)
<i>C. rhizophorae</i>	13	67	20
<i>C. gasar</i>	57	07	36
<i>C. gigas</i>	35	10	55

Experimento II

Após 180 min de exposição ao $MgCl_2$, 100% das ostras *C. gigas* foram anestesiadas. A avaliação do tecido gonádico identificou 28% de machos, 28% de fêmeas e 44% de indivíduos indeterminados dentro do grupo controle (C). No grupo anestesiado (A), foram identificados 33% de machos, 40% de fêmeas e 27% de animais indeterminados.

A análise da motilidade de espermatozoides identificou 80% e 100% de machos ativos nos grupos anestesiados (A) e não anestesiados (C), respectivamente. Do número total de fêmeas, 43% do grupo C e 33% do grupo A apresentaram oócitos numerosos, grandes e arredondados, e foram usados na desova.

O número total de oócitos de fêmeas anestesiadas e não anestesiadas foi $37,5 \times 10^6$ e $40,0 \times 10^6$, respectivamente. Não houve diferenças significativas quanto aos números de larvas-D resultantes dos cruzamentos dentro e entre grupos de animais anestesiados e não anestesiados (Tabela 3). Desta forma, a exposição ao $MgCl_2$ não teve efeito deletério sobre a atividade reprodutiva e a formação de larvas-D de *C. gigas*.

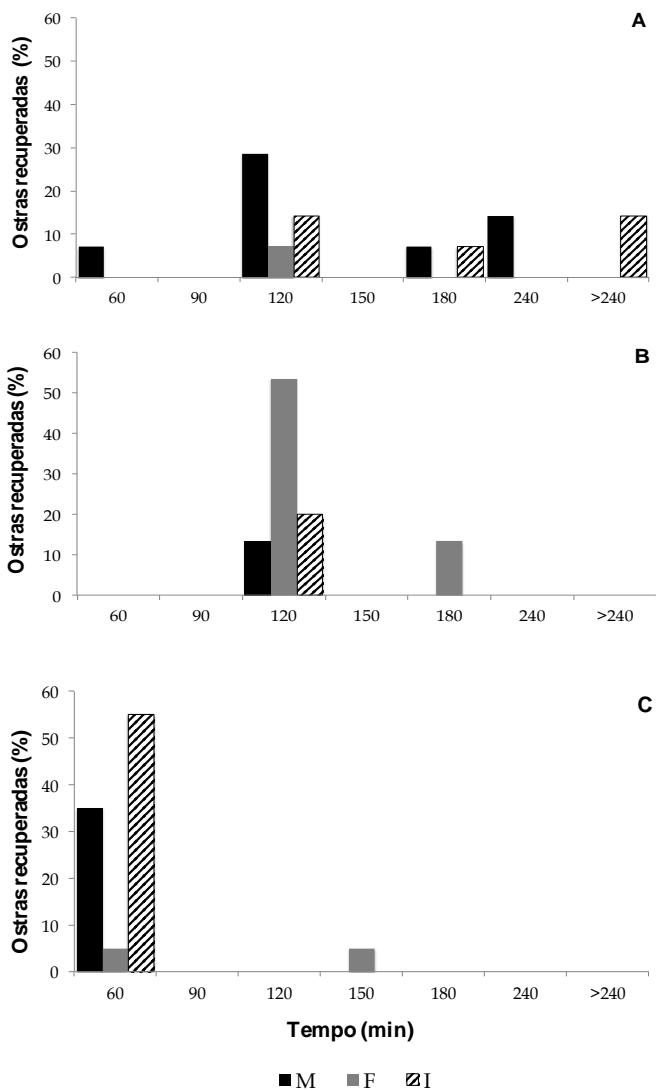


Figura 3. Porcentagens de fêmeas (F), machos (M) e animais indeterminados (I) amostrados e recuperados após exposição ao $MgCl_2$ nas três espécies de ostras estudadas: *C. gasar* (A); *C. rhizophorae* (B); *C. gigas* (C). As porcentagens foram calculadas a cada 30 min até 240 min (4 h) depois da recuperação inicial.

Tabela 3. Número médio e sobrevivência (%) de larvas-D resultantes dos cruzamentos fatoriais dentro e entre grupos de ostras *C. gigas* anestesiadas (A) e não anestesiadas (C). O número de oócitos por cruzamento foi fixado em 150.mL⁻¹.

Cruzamento		Número médio de larvas-D.mL ⁻¹	Sobrevivência de larvas-D (%)
Fêmeas	Machos		
A	A	47 ± 3	32 ± 2
A	C	42 ± 7	28 ± 4
C	A	55 ± 3	37 ± 2
C	C	53 ± 6	36 ± 4

DISCUSSÃO

O sal MgCl₂ provou ser um relaxante muscular efetivo para as três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* estudadas. Após o período de exposição ao anestésico, 100% de recuperação e 100% de sobrevivência foram observadas para cada espécie de ostra. Estes resultados assemelham-se às baixas taxas de mortalidade encontradas anteriormente para outras espécies de gastrópodos (ACOSTA-SALMÓN; DAVIS, 2007) e bivalves (BUTT *et al.*, 2008; SUQUET *et al.*, 2009, 2010; ALIPIA *et al.*, 2014), usando este mesmo composto.

Dentre os estudos disponíveis na literatura, há uma considerável variação entre espécies de moluscos quanto à sua reação a determinados relaxantes e concentrações específicas (para revisão, ver LEWBART e MOSLEY, 2012). Neste trabalho direcionado às ostras do gênero *Crassostrea* cultivadas no Brasil, foram observados 87% de animais anestesiados na espécie *C. gasar* após 12 h de exposição a uma concentração de 50 g.L⁻¹ de MgCl₂, e 100% nas espécies *C. gigas* e *C. rhizophorae* após 6 h de exposição. Usando o mesmo relaxante e a mesma concentração, BUTT *et al.* (2008) demonstraram resultados similares quanto ao tempo para anestesia (6 h) de 100% de ostras-da-rocha de Sidney (*Saccostrea glomerata*), enquanto SUQUET *et al.* (2009) registraram um período de 16 h para anestesiarem totalmente ostras *C. gigas* cultivadas na França. Para as espécies de ostras planas, *Ostrea edulis* (SUQUET *et al.*, 2010) e *Ostrea chilensis* (ALIPIA *et al.*, 2014), a anestesia completa foi obtida após 3 h de exposição a uma concentração de 50-72 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ de MgCl₂, respectivamente.

Nenhum efeito visível de relaxamento foi observado em ostras perliíferas *Pinctada albina* após 1 h de exposição, usando 30 g.L⁻¹ de MgCl₂ (NORTON *et al.*, 1996), ou em ostras *Crassostrea virginica* (YANG *et al.*, 2013), após 36 h de indução em solução salina “Dead sea salt” 5%, contendo 33,3% de MgCl₂.

WOODALL *et al.* (2003) ressaltaram que tempos prolongados de exposição a anestésicos podem ser letais para moluscos, recomendando tratamentos de curto prazo para garantir a restauração das conexões sinápticas entre neurônios injuriados. Na produção de pérolas, os compostos químicos benzocaína e propileno fenoxetol foram usados durante um curto período de tempo para relaxamento (10 min ou mais) e, após uma rápida recuperação (menos de 30 min), não causaram mortalidade nas espécies de ostras perliíferas *Pinctada albina*, *P. margaritifera*, *P. fucata* e *P. maxima* (NORTON *et al.*, 1996; ACOSTA-SALMÓN *et al.*, 2005; MAMANGKEY *et al.*, 2009).

Neste estudo, o aumento do tempo de exposição (12 h) ao MgCl₂ não provocou mortalidades subsequentes na espécie *C. gasar*. O efeito inibitório atuante dos íons Mg²⁺ do cloreto de magnésio sobre a transmissão sináptica de íons Ca²⁺ (KANDEL *et al.*, 2000) pode não ter sido tão eficiente nesta espécie quanto foi em *C. rhizophorae* e *C. gigas*. Para *C. gigas*, tempos maiores de exposição ao MgCl₂ e experimentos repetidos mensalmente em um mesmo grupo de animais também não causaram efeitos negativos sobre a sobrevivência desta espécie (SUQUET *et al.*, 2009). De fato, BUTT *et al.* (2008) concluíram que, embora algumas perturbações imunológicas sejam evidentes durante as primeiras 48 h, o estresse fisiológico associado à exposição a este relaxante não tem impacto de longo prazo (após 96 h) sobre os parâmetros imunológicos de ostras *S. glomerata*.

As diferenças na resposta ao anestésico entre as espécies podem estar relacionadas aos parâmetros físicos (temperatura e salinidade) e químicos (pH) da água. SUQUET *et al.* (2009) demonstraram que um decréscimo na temperatura de 19,5°C para 15,3°C resultou em uma redução significativa da eficiência de anestesia em *C. gigas*. No presente estudo, o relaxamento de *C. gigas* foi mais efetivo na temperatura de 22°C, comparado aos resultados dos autores acima citados. Na espécie *O. edulis*, o aumento da temperatura da água de 14,9°C para 18,8°C também aumentou o número de ostras anestesiadas após 3 h (SUQUET *et al.*, 2010). ACOSTA-SALMÓN e DAVIS (2007) observaram que o aumento da salinidade da água pela adição de MgCl₂ (de 32 para 47), sob uma temperatura de 27,8°C, não causou efeitos adversos no

gastrópodo *Strombus gigas* durante um curto período de exposição (20 min). ALIPIA *et al.* (2014) sugeriram que, na espécie *O. chilensis*, a variação no tempo para anestesia, usando diferentes concentrações de $MgCl_2$, pode ser causado mais por um choque osmótico, do que por qualquer ação neuromuscular deste relaxante. Neste estudo, considerando que a salinidade e a temperatura foram mantidas constantes durante todo o período experimental, a porcentagem mais baixa de ostras anestesiadas da espécie *C. gasar* pode estar relacionada à sua habilidade de manter as valvas fechadas durante longos períodos de tempo. Este comportamento tem sido comumente observado no manuseio dos animais desta espécie durante o trabalho de rotina no LMM-UFSC.

Para as três espécies estudadas, as variações de tamanho em altura da concha (45 a 132 mm) e em peso úmido (35,36 a 55,05 g) não tiveram relação com os tempos para anestesia e recuperação. Estes resultados estão de acordo com NORTON *et al.* (1996) que não observaram associação entre a anestesia e o tamanho dos animais para as espécies de ostra perlífera *P. albina* (tamanho dorsal-ventral: 70 a 100 mm) e *P. margaritifera* (tamanho dorsal-ventral: 90 a 170 mm). Entretanto, discordam de SUQUET *et al.* (2009) que observaram um número maior de animais anestesiados na classe de menor peso. ZAHL *et al.* (2010) também demonstraram que o peso corporal de peixes da espécie *Hippoglossus hippoglossus* afetou os tempos para anestesia e recuperação. Em uma faixa de variação entre 33 e 1.234 g, os peixes maiores levaram mais tempo para serem anestesiados e menos tempo para se recuperarem do efeito anestésico.

Quanto aos procedimentos de amostragem do tecido gonádico após anestesia, as biópsias usando seringas e agulhas, não afetaram a sobrevivência das três espécies de ostras estudadas, *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas*. Resultados semelhantes em ostras anestesiadas e amostradas foram observados para *C. gigas* (SUQUET *et al.*, 2009) e *O. edulis* (SUQUET *et al.*, 2010). Neste estudo, o método de amostragem permitiu ainda a determinação do sexo em indivíduos maduros de cada espécie e pode contribuir no estabelecimento de protocolos para maturação sexual e indução à desova das espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar*.

O cultivo de ostras nativas vem se expandindo no Brasil, elevando a demanda por sementes. Para a produção de sementes em laboratório, a anestesia pode ser uma técnica útil na programação do setor de condicionamento e maturação de reprodutores, permitindo estudos de desenvolvimento gonádico e a separação por sexo, sem

sacrifício de animais. Ambos os aspectos são importantes para equalizar os números de fêmeas e machos maduros usados na desova em massa e para o delineamento de futuros programas de seleção reprodutiva. O estado anestésico pode facilitar a amostragem de tecido para diferentes estudos reprodutivos, desde gametogênese individual até genômica funcional. O protocolo de anestesia testado neste estudo foi eficiente para a sedação completa de *C. rhizophorae*. No entanto, para *C. gasar*, outros tipos de relaxantes devem ser futuramente testados, em concentrações distintas e em diferentes condições de temperatura e salinidade da água, visando à otimização desta técnica aplicada a esta espécie.

CONCLUSÃO

O uso de $MgCl_2$ promoveu o relaxamento muscular de 100% das ostras das espécies *C. rhizophorae* e *C. gigas* após 360 min. Em *C. gasar*, 87% dos animais foram anestesiados após 720 min. As espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar* levaram mais tempo (≥ 240 min) para se recuperar da anestesia do que *C. gigas* (150 min). Não foram verificadas alterações na formação de larvas-D de *C. gigas*.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer Paul Gailey e Paola Tomaselli pela revisão gramatical da língua inglesa. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pelo apoio à pesquisa; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (projeto CNPq-406641/2012-9) e por fornecer subsídios (CNPq-304612/2012-0) a C.M.R. de Melo.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-SALMON, H.; MARTINEZ-FERNANDEZ, E.; SOUTHGATE, P.C. 2005. Use of relaxants to obtain saibo tissue from the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) and the Akoya pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Aquaculture*, 246: 167–172.

ACOSTA-SALMON, H. and DAVIS, M. 2007. Inducing relaxation in the queen conch *Strombus gigas* (L.) for cultured pearl production. *Aquaculture*, 262: 73–77.

ALIPIA, T.T.; MAE, H.; DUNPHY, B.J. 2014. A non-invasive anaesthetic method for accessing the brood chamber of the Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48,3: 350-355, DOI: 10.1080/00288330.2014.909505.

BUTT, D.; O'CONNOR, S.J.; KUCHEL, R.; O'CONNOR, W.A.; RAFTOS, D.A. 2008. Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*, 275: 342–346.

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 2013. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011*. Brasília. 60p.

EPAGRI, EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. 2014. *Síntese informativa da Aquicultura 2013*. Florianópolis. 7p.

FAO, 2005-2015. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*.. Text by Helm, M.M. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 13 April 2005. [Cited 5 February 2015].

FERREIRA, J.F.; NETO, M.O., 2007. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. In: BARROSO, G.F.; POERSCH, L.H.S.; CAVALLI, R.O. (Ed.). *Sistemas de cultivo aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócio-econômicos*. Rio de Janeiro: UFRJ. p. 87 -96.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. 2000. *Principles of neural science*. 4th edn. McGraw-Hill, New York. 1414 p.

LEWBART, G.A. and MOSLEY, C. 2012. Clinical anesthesia and analgesia in invertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21: 59-70.

MAMANGKEY, N.G.F.; ACOSTA-SALMON, H.; SOUTHGATE, P.C. 2009. Use of anaesthetics with the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). *Aquaculture*, 288: 280–284.

- MELO, C.M.R.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C. 2010. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. *Biological Invasions*, 12: 441-449.
- NORTON, J.H., DASHORST, M., LANSKY, T.M., MAYER, R.J. 1996. An evaluation of some relaxants for use with pearl oysters. *Aquaculture*, 144: 39–52.
- POLI, C.R. 2004. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*). In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. (Ed.). *Aqüicultura - experiências brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa, p. 251–266.
- SILVEIRA, R.C; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.M.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. 2011. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. *Brazilian Journal of Biology*. 71: 557-562.
- SUQUET, M.; KERMOYSAN, G.; ARAYA, R. G.; QUEAU, I.; LEBRUN, L.; SOUCHU, P.; MINGANT, C. 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resource*, 22: 29–34.
- SUQUET, M.; ARAYA, R. G.; LEBRUN, L.; QUEAU, I.; MINGANT, C.; ROBERT, R. 2010. Anaesthesia and gonad sampling in the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Aquaculture*, 308: 196-198.
- WOODALL, A.J., NARUO, H., PRINCE, D.J., FENG, Z.P., WINLOW, W., TAKASAKI, M., SYED, N.I., 2003. Anesthetic treatment blocks synaptogenesis but not neuronal regeneration of cultured *Lymnaea* neurons. *Journal of Neurophysiology*, 90: 2232–2239.
- YANG, H.; SUPAN, J.; GUO, X.; TIERSCH, T.R. 2013. Nonlethal sperm collection and cryopreservation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, 32(2): 429-437.
- ZAHL, I.H., KIESSLING, A., SAMUELSEN, O.B., HANSEN, M.K. 2011. Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. *Aquaculture Research*, 42(9): 1235-1245.

CAPÍTULO II.
HIBRIDAÇÃO EXPERIMENTAL ENTRE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Crassostrea* CULTIVADAS NO BRASIL

O artigo será submetido ao periódico *Journal of Shellfish Research*.

Hibridação experimental entre espécies do gênero *Crassostrea* cultivadas no Brasil

Angela Puchnick-Legat¹; Carlos Henrique Miranda de Araújo Gomes²; Jefferson Francisco Alves Legat¹; Aline Thomasi³; Cristiano Valentim da Silva Lazoski⁴; Cláudio Manoel Rodrigues de Melo²

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio-Norte, Grupo de Pesquisa em Aquicultura e Pesca. BR 343, km 35, Caixa Postal 341, CEP: 64200-970, Parnaíba, PI, Brasil, e-mail: angela.legat@embrapa.br

²Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina. Rua dos Coroa, 503, Barra da Lagoa, CEP: 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil

³Fundação Instituto de Pesca do Rio de Janeiro, FIPERJ, Escritório Regional Noroeste Fluminense II. BR 356, km 2, Antigo mercado produtor, CEP: 28300-000, Itaperuna, Rio de Janeiro RJ, Brasil.

⁴Laboratório de Biodiversidade Molecular, Departamento de Genética, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco A, sala A2-98, Ilha do Fundão, CEP: 21941-490, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

Não existem informações sobre os impactos da invasão da ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, sobre as populações naturais de ostras nativas, *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gasar*, na costa sul do Brasil. Com o objetivo de contribuir no conhecimento das possíveis interações entre estas espécies, este trabalho avaliou o sucesso de fecundação cruzada e desenvolvimento de híbridos interespecíficos em condições de laboratório. Cruzamentos recíprocos foram conduzidos entre *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar* durante os anos de 2012 a 2014. Análises PCR-RFLP de genes mitocondriais (16S) e nucleares (ITS-2) foram usadas para confirmar a identidade das espécies e o estado híbrido das progênes. Diferenças no desenvolvimento gonádico

das ostras parentais dificultaram a sincronização da reprodução entre as três espécies. Em todos os experimentos bem sucedidos, houve compatibilidade unidirecional de oócitos de *C. rhizophorae* (R) com espermatozoides de *C. gigas* (G), que resultou em taxas de fecundação relativamente altas, produzindo larvas com crescimento similar à sua espécie materna até os primeiros sete dias de vida. Depois deste período, 100% das larvas RG não desenvolveram umbo e morreram. As análises moleculares revelaram que as progênes RG eram realmente híbridas e continham DNA de ambas as espécies parentais. Além de RG, dois outros casos isolados de assimetria na fecundação resultaram na formação de larvas que não sobreviveram depois dos primeiros sete dias: oócitos de *C. gasar* (B) com esperma de *C. gigas* (G), em janeiro de 2012; e oócitos de *C. rhizophorae* (R) com espermatozoides de *C. gasar* (B), em maio de 2014. No entanto, não foi possível confirmar o estado híbrido destas progênes. Estes resultados evidenciaram que a incompatibilidade genômica entre as três espécies é suficiente para evitar a hibridação natural e que a integridade genética das ostras nativas não está ameaçada pela espécie exótica. No entanto, as interações entre as espécies *C. gigas* e *C. rhizophorae* devem ser monitoradas sob um ponto de vista ecológico-evolutivo integrado.

Palavras-chave: ostras, híbridos interespecíficos, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea rhizophorae*

ABSTRACT

No data information is available on the impacts of the invasive Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, over native oyster populations of *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gasar* in southern Brazil. In order to understand possible interactions between these three species, the present work investigated the fertilization success and the development viability of interspecific hybrids in laboratory conditions. Reciprocal crosses were performed between *C. gigas*, *C. rhizophorae* and *C. gasar* during the reproductive period of 2012 to 2014. PCR-RFLP analyses of mitochondrial (16S) and nuclear (ITS-2) genes were used to confirm the species identity and the hybrid status. It was difficult to obtain gamete sync between the three species because of specific variability in gonadal development of candidate parents. In all successful experiments, there was unidirectional compatibility of *C. rhizophorae* oocytes (R) with *C. gigas* sperm (G), which resulted in relatively high fertilization rates

compared to both intraspecific crosses. Reproductive success in *C. rhizophorae* females x *C. gigas* males (RG) crosses produced larvae with similar growth as their maternal species during the first seven days. After that, 100% RG larvae died before developing to the umbo stage. Molecular analyses revealed that RG larvae contained DNA of the two species and that were true hybrids. Besides RG cross, two isolated cases of fertilization asymmetry produced larvae that did not survive after seven days: *C. gasar* oocytes with *C. gigas* sperm (BG), in January 2012, and *C. rhizophorae* oocytes with *C. gasar* sperm (RB), in May 2014. However, hybrid status in both progenies was not confirmed. These results showed that current genome incompatibilities between species prevent natural hybridization and the genetic integrity of native oysters is not threatened by the invasive exotic species. On the other side, interactions between *C. gigas* and *C. rhizophorae* must be monitored under an integrated ecological and evolutionary approach for planning aquatic ecosystem conservation.

Key-words: oysters, interspecific hybrids, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea rhizophorae*

INTRODUÇÃO

Em vista do seu potencial para crescimento e sua grande tolerância às variáveis ambientais, a ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), foi introduzida como espécie aquícola em muitas regiões do mundo, como alternativa ao esgotamento dos estoques naturais de espécies nativas ou para alavancar a ostreicultura local. No entanto, esta espécie vem se tornando invasora nas regiões em que foi introduzida (RUESINK et al., 2005).

Inúmeros exemplos dos efeitos negativos da invasão de *C. gigas* em ecossistemas costeiros ao redor do mundo foram revisados e descritos por Miossec et al. (2009), incluindo impactos ecológicos, genético-evolutivos e a introdução de patógenos. Segundo esses autores, as populações naturalizadas desta espécie foram encontradas inicialmente próximas às áreas de cultivo e depois houve a colonização de áreas mais distantes, demonstrando a sua grande capacidade de dispersão e de adaptação às condições ambientais.

No Brasil, a ocorrência natural de *C. gigas* foi registrada na costa sul do Brasil por Melo et al. (2010), mas a extensão dos impactos que esta espécie poderá causar aos estoques de ostras nativas *Crassostrea*

rhizophorae (Guilding, 1828) e *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) ainda é desconhecida. Os estudos sobre moluscos exóticos na costa brasileira são escassos e não existem trabalhos publicados que tratem das interações das espécies invasoras com as espécies nativas (TEIXEIRA et al., 2010).

A maior dificuldade de avaliar as invasões biológicas é que se tratam de um processo transdisciplinar envolvendo conhecimentos de biologia, ecologia, fisiologia e evolução aplicados ao longo de múltiplas etapas temporais (BLANCHET et al., 2012). Como as espécies invasoras não compartilham de um passado evolutivo com a comunidade invadida, vários tipos de mudanças genéticas podem ocorrer ao longo do tempo, como hibridação e rearranjos genômicos (SOUZA et al., 2009).

A hibridação natural entre espécies de moluscos introduzidas e nativas tem sido documentada e pode resultar em perdas de variabilidade genética e biodiversidade aquática, representando uma séria ameaça à integridade do “pool” gênico das espécies nativas (PERRY et al., 2002). Em ostras do gênero *Crassostrea*, a hibridação natural foi evidenciada por Huvet et al. (2004), entre *C. gigas* e *C. angulata* na costa de Portugal, usando marcadores microssatélites. Cruzamentos experimentais entre estas espécies demonstraram que os híbridos são férteis (HUVET et al., 2002), que o seu desempenho em cultivo é intermediário ao das espécies parentais e que o desempenho de *C. gigas* é significativamente superior (SOLETCHNIK et al., 2002). Em conjunto, estes resultados indicaram a necessidade de um plano de manejo e conservação das populações naturais de *C. angulata*, em virtude da expansão do cultivo de *C. gigas* na Europa.

Em condições de laboratório, inúmeros cruzamentos foram conduzidos entre espécies do gênero *Crassostrea* para avaliar a viabilidade de híbridos (ALLEN et al., 1993; BANKS et al., 1994; BUSHEK et al., 2008; CAMARA et al., 2008; XU et al., 2011). Alguns resultados semelhantes foram obtidos a partir destes cruzamentos: incompatibilidade gamética unidirecional; menores taxas de fecundação interespecífica do que intraespecífica; menores taxas de sobrevivência e/ou crescimento de híbridos, comparadas às taxas das espécies parentais.

O uso potencial da hibridação na ostreicultura foi demonstrado experimentalmente por Huo et al. (2013), a partir de cruzamentos entre fêmeas de *C. hongkongensis* e machos de *C. ariakensis*, e por Zhang et al. (2015), através de retrocruzamentos entre *C. hongkongensis*, *C. gigas* e híbridos de fêmeas de *C. hongkongensis* com machos de *C. gigas*. No

primeiro estudo (HUO et al., 2013), a fecundação de oócitos de *C. hongkongensis* com espermatozoides de *C. ariakensis* resultou em híbridos com crescimento e/ou sobrevivência superiores à espécie *C. hongkongensis* ao longo das fases de desenvolvimento larval, juvenil e adulto. No estudo mais recente (ZHANG et al., 2015), as progênies dos retrocruzamentos interespecíficos foram viáveis e férteis, apresentando crescimento mais rápido do que as progênies das espécies parentais.

Para as espécies cultivadas no Sul do Brasil, embora alguns experimentos de laboratório tenham sido realizados entre *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* (= *C. gasar*) (ABSHER, 1989) e entre *C. gigas* e *C. gasar* (TURECK, 2010), não foi possível comprovar geneticamente se os híbridos eram verdadeiros. Com o objetivo de contribuir no conhecimento das interações entre estas três espécies como subsídio à conservação genética das ostras nativas, este trabalho avaliou experimentalmente o sucesso de fecundação cruzada e a viabilidade de desenvolvimento de híbridos interespecíficos, usando marcadores de DNA mitocondrial e nuclear para confirmar a sua identidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cruzamentos experimentais entre as espécies *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* foram conduzidos no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil, entre os meses de dezembro e maio dos períodos reprodutivos 2011-2012, 2012-2013 e 2013-2014. A identificação molecular das espécies parentais e das progênies resultantes foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCAI) da UFSC e no Laboratório de Biodiversidade Molecular (LBDM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Coleta das espécies parentais

Exemplares adultos de *C. gigas* e *C. gasar* foram retirados da área de cultivo experimental do LMM-UFSC, localizado na praia de Sambaqui (27°35'S e 48°32'W), Florianópolis. Exemplares de *C. rhizophorae* foram coletados de costões rochosos entre as praias de Sambaqui (27°35'S e 48°32'W) e Cacupé (27°54'S e 48°52'W), Florianópolis. Para *C. rhizophorae*, os espécimes foram coletados na maré baixa, na região do supra-litoral, e analisados quanto à cor e à morfologia externa da concha. Indivíduos com identidade duvidosa

foram descartados das amostras, a fim de evitar uma possível mistura entre as espécies.

Os animais de cada espécie foram separados, identificados e transportados vivos para o LMM-UFSC, localizado na Barra da Lagoa (27°58'S e 48°44'W), Florianópolis, onde foram limpos com jato de água pressurizada e condicionados em tanques para estoque de gametas e uso subsequente nos cruzamentos experimentais.

A transferência dos animais para o laboratório foi feita com base na programação da produção do LMM-UFSC e nas características reprodutivas de cada espécie na costa sul do Brasil, como descrito em Santos (2001) para *C. gigas*, em Christo (2006) para *C. rhizophorae*, e em Gomes (2009) para *C. gasar*. Desta forma, a estratégia foi retirar os indivíduos de cada espécie antes do pico de desova no ambiente natural e condicioná-los em laboratório a uma temperatura que permitisse estocar gametas para os experimentos. Assim, os reprodutores de *C. gigas* foram transferidos do sistema de cultivo no mar em outubro para tanques de condicionamento de 2.000 L, onde foram mantidos em temperatura de 15 a 17°C. Os reprodutores de *C. rhizophorae* e *C. gasar* foram retirados em dezembro e condicionados em tanques de 500 L em temperatura de 22 a 24°C.

No período de condicionamento, todos os indivíduos foram mantidos em sistema de fluxo contínuo de água de 1 L.min⁻¹ e alimento de 500 a 800 mL.min⁻¹, com aeração constante e salinidade de 35. A alimentação foi composta pela microalga *Chaetoceros muelleri* em uma concentração de 20 a 40 x 10⁴ células.mL⁻¹.

Cruzamentos experimentais

Para cada experimento, os animais de cada espécie foram escolhidos aleatoriamente dos tanques de condicionamento, foram pesados, medidos na altura da concha e abertos para a determinação do sexo e da condição dos gametas antes da indução à desova. Amostras do tecido gonádico de cada animal foram raspadas com o uso de uma gilete, colocadas em lâminas de vidro e avaliadas em microscópio ótico binocular com amplificação de 40x e 100x.

Após a determinação do sexo, machos e fêmeas de cada espécie foram selecionados com base no número de espermatozoides ativos e no número de oócitos esféricos de maior diâmetro, respectivamente. O método “strip”, comumente empregado para a reprodução de *C. gigas* em laboratório (FAO, 2005-2015), foi usado neste estudo para conduzir os cruzamentos dentro e entre espécies. Este método consistiu na raspagem do tecido gonádico (“strip”) de fêmeas e machos por espécie

e, em seguida, na fecundação direta de soluções de oócitos com soluções de espermatozoides, contendo água marinha filtrada a 1 μm e esterilizada por luz ultravioleta (UV), com salinidade de 35 e temperatura de 25°C.

Antes da fecundação, os oócitos de cada espécie foram hidratados por 1h em volumes separados de 10 L. Três amostras de 0,2 mL de cada solução de oócitos foram coletadas em câmaras de “Sedgewick-Rafter” e quantificadas em microscópio ótico (40x). Trinta (30) oócitos de cada espécie foram fotografados com o uso de uma câmera acoplada ao microscópio, com amplificação 100x, e posteriormente medidos em seu diâmetro por meio do software LAEZ 2.0.0 (LEICA[®]).

A solução de oócitos por espécie foi dividida proporcionalmente em quatro partes: uma parte não foi fecundada (controle negativo); uma parte foi fecundada com solução de espermatozoides da mesma espécie (controle positivo); uma parte, com solução de espermatozoides da segunda espécie; e uma parte, com solução de espermatozoides da terceira espécie.

Os cruzamentos dentro e entre espécies foram realizados em triplicata, na proporção de sete espermatozoides para um oócito (7:1), em uma concentração de 100 oócitos.mL⁻¹, com a adição de 30 mL de espermatozoides nas soluções de oócitos a cada 20 min, durante 1 h. Soluções de oócitos não fecundados de cada espécie foram mantidas separadamente por 24 h, para avaliar uma possível mistura com espermatozoides que poderia resultar na formação de larvas-D.

Os cruzamentos foram conduzidos para gerar nove progênes possíveis: 1) fêmeas *C. gigas* x machos *C. gigas* (GG); 2) fêmeas *C. gasar* x machos *C. gasar* (BB); 3) fêmeas *C. rhizophorae* x machos *C. rhizophorae* (RR); 4) fêmeas *C. gigas* x machos *C. gasar* (GB); 5) fêmeas *C. gasar* x machos *C. gigas* (BG); 6) fêmeas *C. gigas* x machos *C. rhizophorae* (GR); 7) fêmeas *C. rhizophorae* x machos *C. gigas* (RG); 8) fêmeas *C. gasar* x machos *C. rhizophorae* (BR); e 9) fêmeas *C. rhizophorae* x machos *C. gasar* (RB).

Após os cruzamentos, amostras do músculo adutor das ostras selecionadas como parentais foram coletadas e preservadas em tubos de 2,0 mL com etanol absoluto a -20°C para as análises moleculares subsequentes.

Após 2 h da fecundação, uma amostra de 0,5 mL foi coletada por réplica, por cruzamento, e avaliada em microscópio ótico, com amplificação de 40x e 100x. O sucesso da fecundação em cada cruzamento foi estimado como a razão (%) entre o número de oócitos

em divisão celular e o número total de oócitos, incluindo os não fecundados.

Após 24 h, três amostras de 0,5 mL foram coletadas para a quantificação de larvas-D. A sobrevivência ao estágio D foi determinada como a razão (%) entre o número de larvas-D bem formadas e o número total de oócitos usados na fecundação.

Os números médios de oócitos em divisão celular e de larvas-D obtidas nos cruzamentos foram comparados utilizando-se de teste t com permutação (teste t não paramétrico) ao nível de significância de 5%, por meio do procedimento multtest do programa SAS[®] (WESTFALL et al., 1999).

Larvicultura

As progênes de larvas-D resultantes dos cruzamentos foram cultivadas em sistema estático ou em sistema de fluxo contínuo de água com alimento de 100 mL.min⁻¹ (adaptado do programa de melhoramento de *C. gigas* do “Cawthron Institute”, Nova Zelândia).

As larviculturas em sistema estático foram conduzidas em uma densidade inicial de 5 a 10 larvas.mL⁻¹, em tanques cilindro-cônicos de 80 L, contendo água marinha filtrada e esterilizada com salinidade de 27, temperatura de 25°C e aeração constante.

As larviculturas em sistema de fluxo contínuo foram realizadas em tanques cilindro-cônicos de 5 L, em uma densidade inicial de até 100 larvas D.mL⁻¹, perfazendo um taxa de renovação por tanque em torno de 30 vezes ao dia. A água com alimento foi armazenada em um tanque de 5.000 L, com aeração constante, temperatura de 25°C e salinidade de 27, e foi bombeada para os tanques de 5 L por meio de uma bomba de recirculação de 1,5 cv.

A alimentação fornecida diariamente foi uma dieta de microalgas na concentração de 1 a 1,5 x 10⁴ cel.mL⁻¹ para o sistema estático e de 2 a 6 x 10⁴ cel.mL⁻¹ para o sistema contínuo. A dieta foi composta pelas espécies *Isochrysis galbana* (Iso), *Pavlova lutheri* (Pav) e *Chaetoceros muelleri* (Cm) nos períodos experimentais de 2012 e 2013 e pelas espécies Iso, *Nannochloropsis oculata* (Na), *Chaetoceros calcitrans* (Cc) e Cm no período de 2014.

O manejo das larviculturas foi realizado a cada 48 h, com o peneiramento das larvas em malhas de diferentes tamanhos (35, 50, 70, 100, 145, e 240 µm), seguido da limpeza e troca de água dos tanques. A limpeza dos tanques foi realizada como descrito em Silveira et al. (2011). A cada manejo, as larvas foram avaliadas quanto à motilidade, anatomia e presença de alimento no trato digestório, foram fotografadas

com o uso de uma câmera acoplada ao microscópio, com amplificação de 100x, e posteriormente medidas em altura, por meio do software LAEZ 2.0.0 (LEICA[®]).

As larvas retidas na malha de menor tamanho foram descartadas quando mais de 70% de mortalidade foi observada em uma amostra concentrada de 0,5 mL, de forma a evitar a deterioração da qualidade da água. As taxas de rendimento de larvas por cruzamento foram determinadas a cada 96h, por meio da contagem de três amostras de 0,5 mL em câmaras de “Sedgewick-Rafter” e microscópio (40x e 100x), ou quando houve um aumento notório do número de larvas mortas em um determinado cruzamento de um manejo para o outro. Nos casos de mortalidade massiva de larvas, os experimentos foram finalizados.

Nos eventos de mortalidade e/ou ao final da larvicultura, amostras concentradas de larvas (0,5 mL) foram coletadas de cada cruzamento em tubos de 15 mL contendo etanol absoluto e foram preservadas a -20°C até as análises genéticas.

Sub-amostras de larvas de cada cruzamento foram separadas no microscópio, individualmente ou em grupos (5, 10, 20 e 50 indivíduos), usando membranas filtrantes tipo HA com tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore[®]) e microtubos capilares (Perfecta). Em seguida, foram acondicionadas em microtubos de 0,2 mL contendo soluções de lise para as extrações de DNA.

Confirmação genética das espécies parentais e progênes

Extrações de DNA e análises PCR-RFLP

As extrações de DNA das ostras adultas parentais foram realizadas a partir de aproximadamente 20 mg de tecido, usando um protocolo CTAB (CTAB 2%, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, NaCl 1,4 mM), descrito em Gusmão e Solé-Cava (2002). O DNA foi ressuspense em 50 µL de água ultrapura e quantificado em nano-fotômetro (Implen[®]). Todas as amostras foram normalizadas na concentração de 30 ng.µL⁻¹ para uso nas reações da polimerase em cadeia (PCR).

Para as larvas, quatro protocolos de lise foram testados: 1) 25 µL de água ultrapura e 5 µL de proteinase K (10 mg.mL⁻¹); 2) 25 µL de tampão (Tris HCl pH 8,8 670 mM, Sulfato de amônio 166 mM, Tween-20 0,1%) e 5 µL de proteinase K (1 mg.µL⁻¹), segundo descrito em Taris et al. (2005); 3) 25 µL de tampão PCR 1x (Promega); 4) 100 µL de tampão CTAB, 5 µL de proteinase K (10 mg.mL⁻¹) e 25 µL de esferas magnéticas (Agencourt[®] AMPure[®] XP).

Nos protocolos 1 e 2, as amostras foram incubadas em termociclador (Applied Biosystem) a 56°C por 1 h e, em seguida, a 95°C por 20 min. No protocolo 3, foram congeladas em Nitrogênio (N₂) líquido, incubadas em termociclador a 95°C por 20 min e em banho ultrassônico a 25°C por 5 min. Nesses três procedimentos, as soluções de lise foram diretamente usadas nas reações de PCR.

No protocolo 4, esferas magnéticas foram adicionadas às soluções de lise após a incubação a 56°C, para otimizar a recuperação do DNA que foi realizada com o uso de uma placa magnética, conforme as orientações do fabricante (Agencourt® AMPure® XP). Após as etapas de incubação com as esferas e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspensão em 30 µL de água ultrapura e transferido a um outro microtubo para as PCRs.

O kit de purificação “DNeasy tissue kit” (Qiagen) também foi usado para a extração de DNA de amostras concentradas de larvas, conforme as recomendações do fabricante. As larvas preservadas nos tubos de 15 mL com etanol absoluto foram pipetadas em tubos de 1,5 mL previamente pesados em balança analítica de precisão de 0,0001g. Em seguida, foram centrifugadas rapidamente a 8.000 rpm para a retirada do excesso de etanol e novamente pesadas após a evaporação total do etanol em banho seco a 35°C. A diferença entre os valores da segunda e da primeira pesagem de cada microtubo foi a quantidade de larvas (5 a 20 mg) usada nas reações do kit..

A identificação das espécies parentais e das progênes resultantes dos cruzamentos foi confirmada por meio de análises PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) de genes mitocondriais e nucleares, usando os padrões descritos anteriormente em Melo et al. (2010).

As reações PCR utilizaram os pares de iniciadores: 16SAR [5' – CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT–3'] e 16SBR [5' – CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T – 3'] (KESSING et al., 1989), para a amplificação de um fragmento de 560 pares de bases (pb) do gene mitocondrial que codifica a subunidade maior do rRNA (16S); e PH19 [5' – CAT CGA CAC TT(T/C) GAA CGC A – 3'] e ITS2 [5' – AAT CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T – 3'] (DIXON et al., 1995), para a amplificação da região do espaçador interno transcrito do rDNA nuclear (ITS-2) com 650 pb, aproximadamente.

As amplificações foram conduzidas em um volume total de 15 µL, contendo 1 X tampão PCR (Promega), 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,13 µM de cada iniciador, 1 U de *Flexi* Taq DNA polimerase (Promega) e 30 ng de DNA, em um termociclador (Applied Biosystem)

programado para um ciclo inicial de 94 °C, por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50° C por 1 min e 72 °C por 1 min; e um ciclo final de 72 °C por 5 min.

Os produtos PCR das regiões 16S e ITS-2 foram digeridos com a enzima Hae III para gerar padrões RFLP específicos. As reações de digestão foram conduzidas em termociclador a 37°C, durante 5 h ou “overnight”, em um volume total de 15 µL, contendo 5 µL do produto PCR não purificado e 1 U de enzima em 1X do tampão, conforme recomendado pelo fabricante (Biolabs ou Invitrogen). Os fragmentos RFLP foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de etídio, sob luz UV, e fotografados com câmera digital. Os tamanhos dos fragmentos de 16S e ITS-2 foram estimados por meio do marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder e comparados aos padrões RFLP descritos em Melo et al (2010a).

RESULTADOS

Reprodução e desenvolvimento embrionário

Observaram-se diferenças no estado de desenvolvimento gonádico dentro e entre espécies, as quais dificultaram a sincronização dos cruzamentos entre *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar* durante o período experimental de 2011 a 2014. De um total de dez experimentos realizados (2 em 2011; 3 em 2012; 2 em 2013; e 3 em 2014), houve sucesso em apenas quatro (Tabelas 1). Nos outros seis experimentos, os animais de pelo menos uma espécie apresentaram tecido gonádico indiferenciado ou com gametas de um único sexo.

Os oócitos de *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar* usados nos cruzamentos mediram respectivamente 52,48 µm (± 4,69), 46,63 µm (± 2,46) e 45,60 µm (± 3,92) de diâmetro após 1 h de hidratação. A ausência de desenvolvimento embrionário após 24 h da fecundação nos controles que continham apenas óocitos confirmou que não houve mistura com espermatozoides de qualquer espécie, validando os cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos.

Cruzamentos intraespecíficos

Divisões meióticas foram sempre observadas após a fecundação nos controles de *C. gigas* (GG), *C. rhizophorae* (RR) e *C. gasar* (BB) ao longo do período experimental. Enquanto os oócitos fecundados de *C. gigas* e *C. rhizophorae* geraram larvas-D normais que se desenvolveram em todos os experimentos, os oócitos de *C. gasar* formaram larvas-D

apenas em janeiro de 2013 (Tabela 2). Neste experimento, as taxas de fecundação nos controles BB, GG e RR foram estatisticamente iguais e a taxa de sobrevivência ao estágio-D em BB foi igual a GG e significativamente maior do que RR ($p < 0,01$). Porém, as larvas BB não se desenvolveram adequadamente e morreram antes do quinto dia de larvicultura. Nos outros experimentos, as taxas em BB foram significativamente mais baixas do que em GG ($p < 0,001$) e RR ($p < 0,001$). As taxas de fecundação em RR comparadas a GG foram iguais em janeiro de 2012 e janeiro de 2013, mais baixas ($p < 0,02$) em abril de 2013 e mais altas ($p < 0,02$) em 2014. Já as sobrevivências ao estágio-D em RR e GG foram semelhantes em todos os experimentos, exceto em janeiro de 2013, quando as porcentagens de larvas RR foram significativamente mais baixas ($p < 0,01$).

Tabela 1. Dados de peso total e altura da concha (média \pm desvio padrão), números de animais abertos e avaliados quanto ao sexo e números de fêmeas (F) e machos (M) selecionados como parentais nos cruzamentos experimentais bem sucedidos entre as espécies *C. gigas* (G), *C. rhizophorae* (R) e *C. gasar* (B).

Mês/ Ano	Espécie	Peso (g)	Altura (mm)	Animais avaliados	Animais selecionados	
					F	M
Janeiro/ 2012	G	288 \pm 66	139 \pm 08	10	04	02
	R	14 \pm 05	42 \pm 07	55	29	12
	B	90 \pm 36	76 \pm 10	25	04	04
Janeiro/ 2013	G	244 \pm 77	122 \pm 19	15	05	03
	R	25 \pm 06	47 \pm 07	60	11	07
	B	39 \pm 15	64 \pm 09	55	08	07
Abril/ 2013	G	249 \pm 72	122 \pm 17	10	04	02
	R	25 \pm 05	49 \pm 06	40	09	03
	B	37 \pm 09	62 \pm 06	40	0	0
Maio/ 2014	G	280 \pm 82	125 \pm 10	50	05	07
	R	21 \pm 06	48 \pm 05	50	19	06
	B	45 \pm 15	64 \pm 07	100	04	09

Tabela 2. Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos intraespecíficos de *C. gigas* (GG), *C. rhizophorae* (RR) e *C. gasar* (BB). OF = porcentagem de oócitos em divisão meiótica após 2 h da fecundação; LD = porcentagem de larvas-D bem formadas após 24 h da fecundação.

Grupo	Janeiro 2012		Janeiro 2013		Abril 2013		Maio 2014	
	OF	LD	OF	LD	OF	LD	OF	LD
GG	69±2	26±6	70±3	17±3	89±2	69±4	32±2	05±0
RR	78±3	31±2	68±3	04±2	18±2	13±5	68±4	09±2
BB	49±3	0	69±4	18±2	0	0	11±2	0

Cruzamentos interespecíficos

O sucesso dos cruzamentos interespecíficos variou de um experimento para outro, mas houve compatibilidade gamética unidirecional entre as espécies.

C. rhizophorae x *C. gigas*

Oócitos de *C. rhizophorae* (R) foram fecundados com espermatozoides de *C. gigas* (G) em porcentagens relativamente altas e se desenvolveram em larvas-D normais em todos os experimentos. Em contraste, as taxas de fecundação de oócitos de *C. gigas* (G) com espermatozoides de *C. rhizophorae* (R) foram muito baixas e não houve formação de larvas-D (Tabela 3).

No cruzamento GR, divisões meióticas foram observadas durante os experimentos de 2013: no mês de janeiro, a porcentagem de oócitos em divisão foi significativamente menor do que em ambos os controles parentais GG ($p < 0,001$) e RR ($p < 0,001$); e no mês de abril, foi similar ao controle da espécie paterna (RR) e inferior ao controle da espécie materna GG ($p < 0,02$).

No cruzamento RG, as taxas de desenvolvimento embrionário diferiram estatisticamente em comparação com os controles parentais RR e/ou GG ao longo de todo o período experimental. Em janeiro de 2012, a porcentagem de divisões meióticas em RG foi significativamente mais alta do que em RR ($p < 0,01$) e GG ($p < 0,001$), resultando em uma porcentagem igual de larvas-D (RG = RR = GG). Em janeiro de 2013, a taxa de fecundação em RG foi mais baixa do que

em RR ($p < 0,01$) e GG ($p < 0,001$), produzindo larvas-D em porcentagem igual à espécie materna RR e em porcentagem menor do que na espécie paterna GG ($p < 0,005$). Em abril de 2013, a taxa de fecundação em RG foi igual a RR e menor do que em GG ($p < 0,03$) e as taxas de sobrevivência ao estágio-D foram iguais. Em maio de 2014, a taxa de fecundação em RG foi igual a RR e maior do que em GG ($p < 0,001$), resultando em uma taxa superior de sobrevivência ao estágio-D em relação a RR ($p < 0,002$) e GG ($p < 0,001$).

Tabela 3. Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos entre ostras *C. rhizophorae* (R) e *C. gigas* (G). OF = porcentagem de oócitos em divisão meiótica após 2 h da fecundação; LD = porcentagem de larvas-D bem formadas após 24 h da fecundação. Em cada cruzamento (grupo), a primeira letra corresponde às fêmeas e a segunda letra, aos machos de uma espécie.

Grupo	Janeiro 2012		Janeiro 2013		Abril 2013		Maio 2014	
	OF	LD	OF	LD	OF	LD	OF	LD
GG	69±2	26±6	70±3	17±3	89±2	69±4	32±2	05±0
GR	0	0	06±2	0	01±0	0	0	0
RG	93±5	27±3	54±3	02±1	22±2	12±1	83±15	39±13
RR	78±3	31±2	68±3	04±2	18±2	13±5	68±4	09±2

C. rhizophorae x *C. gasar*

Oócitos de *C. gasar* (B) foram fecundados com espermatozoides de *C. rhizophorae* (R) em uma porcentagem muito baixa, apenas em maio de 2014, e não resultaram em larvas-D (Tabela 4). A taxa de fecundação no cruzamento BR foi semelhante ao controle da espécie materna BB e significativamente menor do que no controle da espécie paterna RR ($p < 0,001$).

Divisões meióticas foram observadas em oócitos de *C. rhizophorae* (R) fecundados com espermatozoides de *C. gasar* (B) em janeiro de 2012, janeiro de 2013 e maio de 2014, mas a formação de larvas-D só ocorreu em 2014 (Tabela 4). Neste experimento, a taxa de fecundação em RB foi igual ao controle materno RR e maior do que no controle paterno BB ($p < 0,002$). A porcentagem de larvas híbridas RB foi semelhante a RR e não houve formação de larvas BB. Nos outros

experimentos, as taxas de fecundação em RB foram significativamente mais baixas do que RR ($p < 0,001$) e BB ($p < 0,001$).

Tabela 4. Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos entre ostras *C. rhizophorae* (R) e *C. gasar* (B). OF = porcentagem de oócitos em divisão meiótica após 2 h da fecundação; LD = porcentagem de larvas-D bem formadas após 24 h da fecundação. Em cada cruzamento, a primeira letra corresponde às fêmeas e a segunda letra, aos machos de uma espécie.

Grupo	Janeiro 2012		Janeiro 2013		Abril 2013		Maio 2014	
	OF	LD	OF	LD	OF	LD	OF	LD
RR	78±3	31±2	68±3	04±2	18±2	13±5	68±4	09±2
RB	31±2	0	12±2	0	0	0	56±18	17±3
BR	0	0	0	0	0	0	01±0	0
BB	49±3	0	69±4	18±2	0	0	11±2	0

C. gasar x *C. gigas*

Não houve fecundação de oócitos de *C. gigas* com espermatozoides de *C. gasar*. Já os oócitos de *C. gasar* (B) foram fecundados com espermatozoides de *C. gigas* (G) em janeiro de 2012, janeiro de 2013 e maio de 2014, mas se desenvolveram em larvas-D apenas em janeiro de 2012 (Tabela 5). Neste experimento, a taxa de fecundação em BG foi estatisticamente menor do que nos controles parentais BB ($p < 0,02$) e GG ($p < 0,001$). A sobrevivência ao estágio-D em BG foi mais baixa do que na espécie paterna GG e não pôde ser comparada com BB que não formou larvas-D. No experimento de janeiro de 2013, a taxa de fecundação em BG foi mais baixa do que nos controles parentais BB ($p < 0,001$) e GG ($p < 0,001$) e, em maio de 2014, as taxas foram similares nos três cruzamentos.

3.2 Crescimento e sobrevivência de larvas

As sobrevivências das larvas de *C. rhizophorae*, *C. gigas*, *C. gasar* e de seus híbridos, cultivadas em sistema de fluxo contínuo de água, foram prejudicadas pelo acúmulo de matéria orgânica nos tanques e pela proliferação de bactérias *Pseudomonas* sp. Em janeiro de 2012, as progêneses híbridas BG e RG morreram antes do quinto dia de

larvicultura. Em janeiro de 2013, a sobrevivência das larvas RG reduziu de 52% no quinto dia para 38% no nono dia e 0% no 13^o dia de cultivo. Um total de 11% da progênie de *C. rhizophorae* (RR) e 12% da progênie de *C. gigas* (GG) sobreviveram ao 13^o dia.

A avaliação das larvas cultivadas em sistema estático confirmou a inviabilidade no desenvolvimento de híbridos interespecíficos. Em abril de 2013, a sobrevivência de híbridos RG decaiu de 69% no quinto dia para 14% no sétimo dia, chegando a menos de 1% no nono dia de cultivo, quando os controles RR e GG apresentaram 10% e 27% de larvas vivas, respectivamente. Em maio de 2014, a sobrevivência das larvas RG diminuiu de 58% no quinto dia para 12% no sétimo dia e 0% no nono dia de cultivo, quando RR e GG apresentaram respectivamente taxas de 27% e 34% de rendimento de larvas. Nos híbridos RB, a taxa de sobrevivência manteve-se acima de 50% até o sétimo dia de cultivo, quando decaiu rapidamente para 0% no nono dia.

Tabela 5. Taxas de desenvolvimento embrionário resultantes de cruzamentos entre ostras *C. gasar* (B) e *C. gigas* (G). OF = porcentagem de oócitos em divisão meiótica após 2 h da fecundação; LD = porcentagem de larvas-D bem formadas após 24 h da fecundação. Em cada cruzamento, a primeira letra corresponde às fêmeas e a segunda letra, aos machos de uma espécie.

Grupo	Janeiro 2012		Janeiro 2013		Abril 2013		Maio 2014	
	OF	LD	OF	LD	OF	LD	OF	LD
GG	69±2	26±6	70±3	17±3	89±2	69±4	32±2	05±0
GB	0	0	0	0	0	0	0	0
BG	36±3	04±2	28±5	0	0	0	19±1	0
BB	49±3	0	69±4	18±2	0	0	11±2	0

Os dados de crescimento em altura da concha (média ± desvio padrão) de larvas híbridas RG e larvas dos controles parentais, *C. rhizophorae* (RR) e *C. gigas* (GG), cultivadas nos sistemas contínuo e estático, estão apresentados na Figura 1. A disponibilidade de alimento em fluxo contínuo promoveu um desenvolvimento mais rápido das larvas GG e RR. No nono dia de larvicultura em sistema contínuo, todas as larvas GG e algumas RR já possuíam umbo bem formado, enquanto

que, no sistema estático, ambas as espécies estavam formando o umbo e apresentavam um comprimento comparativamente menor. Por outro lado, as larvas RG não desenvolveram umbo e a sua altura média observada no nono dia de cultivo do sistema contínuo ($74,76 \mu\text{m} \pm 4,91$) foi semelhante ao comprimento no sétimo dia do sistema estático ($73,25 \mu\text{m} \pm 2,36$). Embora não haja comparação com um dos controles parentais (BB), o crescimento dos híbridos RB foi semelhante à espécie materna (RR) até os primeiros sete dias, quando as larvas pararam de crescer e começaram a morrer.

3.3 Identificação molecular das espécies de ostras parentais e larvas

As análises PCR-RFLP das regiões 16S do genoma mitocondrial e ITS-2 do genoma nuclear de ostras adultas parentais confirmaram a identificação das três espécies do gênero *Crassostrea* usadas nos cruzamentos experimentais e separadas com base nos caracteres de cor e morfologia externas da concha.

As análises de larvas foram realizadas apenas para os cruzamentos GG, RG e RR, nos anos 2013 e 2014, totalizando 120 amostras de cada cruzamento. Não foi possível realizar as análises das larvas BB, RB e BG devido à degradação das amostras, embora tenham sido submetidas ao mesmo protocolo de coleta, separação e preservação.

Os quatro protocolos testados para a extração de DNA de larvas em amostras individuais e em grupos (5, 10, 20 e 50 indivíduos) não foram eficazes, resultando em baixas concentrações ($< 5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de DNA com qualidade insuficiente para análises PCR-RFLP consistentes. Houve sucesso em 4% do total de amostras, 3% pelo protocolo 1 de lise (água ultrapura + proteinase K + temperatura) e 1% pelo protocolo 4 (tampão CTAB + proteinase K + esferas magnéticas).

Para a região 16S do genoma mitocondrial, dois perfis diferentes de fragmentos foram gerados: (1) em larvas GG, que foi concordante com o padrão RFLP descrito na literatura para a espécie *C. gigas*; (2) em larvas RG e RR, que coincidiu com o padrão descrito para a espécie *C. rhizophorae* (Figura 2). Portanto, houve confirmação da herança materna de *C. rhizophorae* no genoma dos híbridos RG.

Para a região ITS-2 do genoma nuclear, a partir das extrações com o “DNeasy tissue kit” (Qiagen), os padrões RFLP gerados permitiram a identificação do DNA de ambas as espécies parentais no genoma das larvas híbridas RG em 2013 e 2014 (Figura 3).

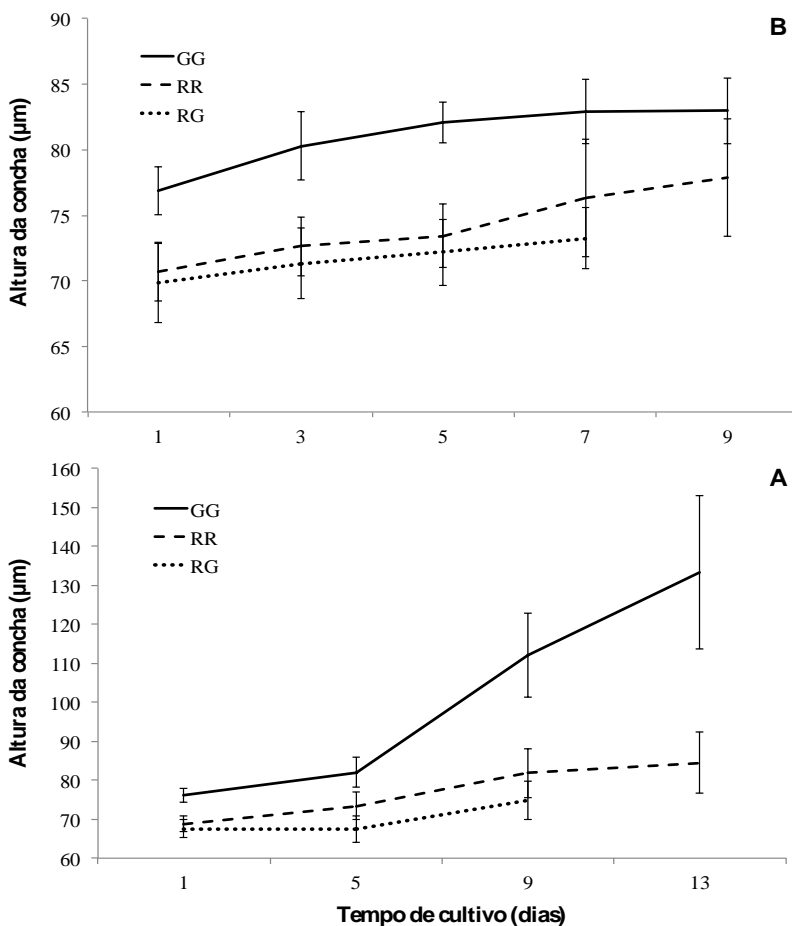


Figura 1. Crescimento em altura da concha (média \pm desvio-padrão) de larvas de ostras *C. gigas* (GG) e *C. rhizophorae* (RR) e de larvas híbridas de fêmeas de *C. rhizophorae* com machos de *C. gigas* (RG), cultivadas em sistema de fluxo contínuo (A) e sistema estático (B).

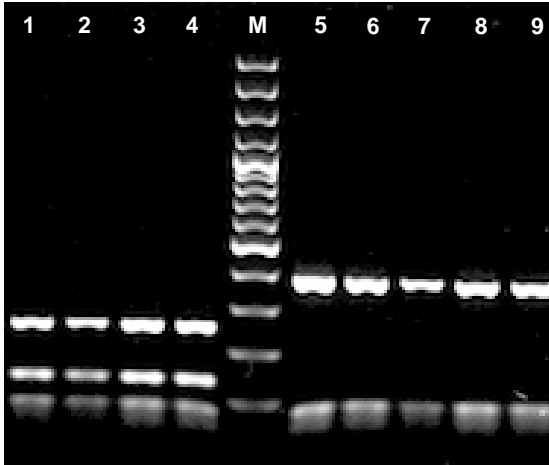


Figura 2. Padrões RFLP com a enzima HaeIII da região 16S do genoma mitocondrial de larvas de ostras *C. rhizophorae* (RR; 1 e 2), *C. gigas* (GG; 5 a 9) e larvas híbridas de fêmeas de *C. rhizophorae* com machos de *C. gigas* (RG; 3 e 4). M = marcador 100bp DNA Ladder.

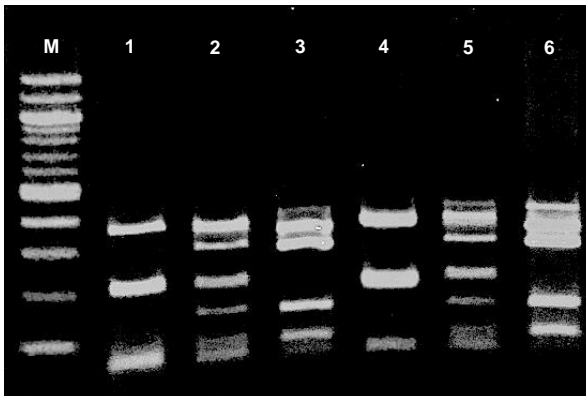


Figura 3. Padrões RFLP com a enzima HaeIII da região ITS-2 do genoma nuclear de larvas de ostras *C. rhizophorae* (RR; 1 e 4), *C. gigas* (GG; 3 e 6) e larvas híbridas de fêmeas de *C. rhizophorae* com machos de *C. gigas* (RG; 2 e 5). M = marcador 100bp DNA Ladder.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a variabilidade no estado de desenvolvimento gonádico das espécies *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar* foi um dos aspectos limitantes para o sucesso dos cruzamentos, mesmo com a estratégia de coletar os animais e condicioná-los em laboratório antes do pico de desova natural, a fim de manter estoques de gametas sexualmente maduros. Essas diferenças podem estar associadas à influência das variáveis ambientais sobre os ciclos de gametogênese, já descritas anteriormente para espécies de ostras e outros moluscos bivalves (MACKIE, 1984; THOMPSON et al., 1996). Em laboratório, Lanan et al. (1980) demonstraram que o estado de desenvolvimento gonádico dos pais na desova afeta a sobrevivência de larvas de *C. gigas* e que os oócitos que fornecem o maior sucesso de assentamento são aqueles produzidos em um intervalo de condicionamento ótimo durante a gametogênese, influenciado por fatores genéticos e ambientais.

Para a espécie *C. gasar* e seus híbridos, o método de desova por “strip” pode ter sido um fator negativo sobre o sucesso reprodutivo. O método envolve a raspagem do tecido gonádico que, nesta espécie, pode apresentar-se em diferentes fases de desenvolvimento em um único indivíduo (LEGAT, 2015). Sendo assim, mesmo nas fêmeas sexualmente maduras selecionadas para a desova, o “strip” pode coletar oócitos que não estão em condições ótimas para o desenvolvimento embrionário. Consequentemente, embora tenham sido observadas divisões meióticas após 2h da fecundação nos cruzamentos intraespecíficos BB e interespecíficos BG e BR, houve sobrevivência ao estágio-D em BB e BG em apenas um experimento (Tabela 2). Mesmo quando larvas-D de *C. gasar* foram formadas, elas não se desenvolveram normalmente e morreram antes do quinto dia de idade, ao contrário das larvas de *C. gigas* e *C. rhizophorae* que sobreviveram ao longo do tempo de cultivo. Esta hipótese está de acordo com inúmeros experimentos anteriores realizados no LMM-UFSC, que não obtiveram sucesso na produção de larvas de *C. gasar* a partir deste método de desova (MELO, C.M.R, comunicação pessoal).

Como ressaltado por Gosling (2003), moluscos bivalves possuem mecanismos de isolamento reprodutivo para prevenir cruzamentos entre espécies congêneres e cruzamentos intraespecíficos entre indivíduos aparentados. Dentro do gênero *Crassostrea*, os fatores que afetam a fecundação dentro e entre as espécies de ostras não são completamente entendidos, mas incluem a qualidade, longevidade e concentração de gametas, a compatibilidade e as interações entre gametas (LANAN et

al., 1980; GAFFNEY et al., 1993; BOUDRY et al., 2002; BUSHEK et al., 2008).

Os resultados deste estudo demonstram que a hibridação entre *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* é possível em uma direção e pode gerar larvas-D normais. Oócitos de *C. rhizophorae* podem ser fecundados por espermatozoides de *C. gasar* (RB) e de *C. gigas* (RG), e oócitos de *C. gasar* podem ser fecundados pelos espermatozoides de *C. gigas* (BG). Por outro lado, os oócitos de *C. gigas* não são fecundados pelo espermatozoides de *C. gasar* (GB) e os espermatozoides de *C. rhizophorae* raramente são capazes de fecundar os oócitos de *C. gasar* (BR) e *C. gigas* (GR), não formando larvas-D.

O sucesso de fecundação assimétrica tem sido comumente descrito entre espécies do gênero *Crassostrea*: oócitos de *C. ariakensis* (= *C. rivularis*) x esperma de *C. virginica* (ALLEN et al., 1993; BUSHEK et al., 2008); oócitos de *C. sikamea* x esperma de *C. gigas* (BANKS et al., 1994; CAMARA et al., 2008); oócitos de *C. sikamea* x esperma de *C. ariakensis* (XU et al., 2009); oócitos de *C. hongkongensis* x esperma de *C. gigas* (ZHANG et al., 2012); oócitos de *C. hongkongensis* x esperma de *C. ariakensis* (HUO et al., 2013). Nestes trabalhos, as taxas de fecundação e sobrevivência ao estágio-D nos cruzamentos interespecíficos foram menores e mais variáveis do que nos cruzamentos intraespecíficos, mostrando claramente efeitos maternos e paternos. Estas observações aplicam-se ao presente trabalho, aos cruzamentos *C. gasar* x *C. gigas* (BG), *C. rhizophorae* x *C. gasar* (RB) e *C. rhizophorae* x *C. gigas* (RG), embora alguns resultados de RG tenham sido contrastantes.

As taxas de fecundação em BG foram significativamente menores do que nos controles parentais BB e GG; a sobrevivência de larvas-D híbridas, quando ocorreu, foi significativamente menor do que GG e esteve relacionada possivelmente à eficiência do esperma de *C. gigas*, visto que as larvas de *C. gasar* (BB) não se formaram. As taxas de fecundação em RB foram inferiores aos cruzamentos intraespecíficos (RR e BB) em todos os casos, exceto no único experimento, quando houve porcentagens de oócitos em divisão e larvas-D iguais ao controle da espécie materna (RR) e superiores à espécie paterna (BB). A qualidade dos oócitos de *C. rhizophorae* parece ter sido determinante na formação das larvas híbridas RB, considerando que as larvas do controle RR se desenvolveram normalmente e as larvas BB não. Já as taxas de fecundação em RG foram relativamente altas ao longo de todo o período experimental, possivelmente devido à compatibilidade gamética potencializada de determinadas combinações entre machos e fêmeas das

espécies parentais. Com exceção de janeiro de 2013, quando a taxa de oócitos em divisão foi significativamente inferior a GG e RR, e de abril de 2013, quando foi inferior a GG, o sucesso da fecundação em RG foi igual ou maior do que nos cruzamentos intraespecíficos, resultando sempre na formação de larvas-D normais. Estes fatos indicam que a reprodução entre fêmeas de *C. rhizophorae* e machos de *C. gigas* (RG) é consistente e reproduzível.

Apesar de os zigotos dos cruzamentos interespecíficos RG, RB e BG desenvolverem-se normalmente a partir da fecundação para formar larvas-D, os híbridos não sobreviveram após a primeira semana de idade. Este padrão de baixa sobrevivência em larvas híbridas interespecíficas foi observada para diversas espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (ALLEN et al., 1993; BANKS et al., 1994, BUSHEK et al. 2008, CAMARA et al. 2008, XU et al. 2009).

Neste estudo, a hibridação não teve efeitos sobre o crescimento das larvas RG entre os primeiros 7-9 dias de cultivo. A altura média das larvas híbridas foi similar à das larvas RR e inferior à das larvas GG (Figura 1), o que sugere um efeito materno no estágio inicial do desenvolvimento. Efeitos maternos são comumente detectados na viabilidade e na taxa de crescimento larval de ostras, como demonstrado em estudos anteriores sobre hibridação intraespecífica (HEDGECOCK et al., 1995; LAUNEY; HEDGECOCK, 2001) e interespecífica (ALLEN et al., 1993; SOLETCHNIK et al., 2002; XU et al., 2009; HUO et al., 2013). Tais efeitos são esperados, visto que o desenvolvimento inicial é sustentado pelas reservas de nutrientes armazenados nos oócitos, durante o período de maturação das fêmeas e da oogênese antes da desova (GALLAGER; MANN, 1986; HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004).

Para as larvas RG, as análises PCR-RFLP das regiões 16S do genoma mitocondrial e ITS-2 do genoma nuclear confirmaram a incorporação do DNA de ambas as espécies de ostras *C. rhizophorae* e *C. gigas* no genoma híbrido. Além disso, confirmaram que a separação morfológica dos adultos das espécies parentais foi realizada corretamente, corroborando os trabalhos publicados anteriormente sobre a utilidade destes marcadores moleculares na diferenciação de ostras do gênero *Crassostrea* (LAPÈGUE et al., 2002; PIE et al., 2006; MELO et al., 2010; LAZOSKI et al., 2011). Desta forma, estes marcadores podem ser usados conjuntamente em estudos subsequentes de hibridação interespecífica, para contribuir no monitoramento da invasão de *C. gigas* na costa Sul do Brasil.

Nas presentes condições experimentais, as larvas híbridas RG cresceram mais lentamente do que ambas as espécies parentais, pararam de crescer após os primeiros sete dias e morreram, o que sugere que o genoma híbrido tem efeitos negativos sobre o crescimento e a sobrevivência quando os efeitos maternos estão ausentes. Estes resultados foram similares às observações de Allen et al. (1993) para larvas híbridas entre *C. virginica*, *C. gigas* e *C. rivularis* (= *C. ariakensis*) que pareciam normais, mas que cresceram menos e sobreviveram por menor tempo do que os controles parentais. Segundo estes autores, a parada no crescimento ocorreu após a primeira semana, seguida de mortalidades massivas até 10-12 dias de cultivo. Para híbridos entre *C. sikamea* e *C. ariakensis*, Xu et al. (2009) confirmaram que os efeitos maternos podem permanecer por uma a duas semanas e depois a incompatibilidade genômica se torna mais importante.

A incompatibilidade genômica entre *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* é concordante com os resultados de análises comparativas de cariótipos que detectaram divergência cromossômica e dividiram estas espécies em três grupos distintos, (LEITÃO et al., 1999). Apesar de apresentarem o mesmo número de cromossomos ($n=20$), a divergência cromossômica pode ocorrer em cariótipos aparentemente conservados e desempenhar um papel importante no isolamento reprodutivo e na especiação (WANG et al., 2004).

Os resultados deste estudo evidenciaram que as interações entre os gametas de *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* existem e podem formar larvas, mas que estas larvas não sobrevivem em condições de laboratório. Estas observações implicam que tais híbridos provavelmente não sobreviveriam no ambiente. De fato, análises de marcadores de DNA mitocondrial e nuclear que registraram a ocorrência natural de *C. gigas* na costa Sul do Brasil (MELO et al., 2010), não detectaram a presença de híbridos entre as espécies de ostras nativas e exótica.

A dificuldade de se obter experimentalmente cruzamentos bem sucedidos entre estas espécies é um aspecto positivo para a conservação genética das ostras nativas. Em condições naturais, a maior complexidade entre fatores genéticos e ambientais minimiza a probabilidade de uma desova sincrônica e o risco de hibridação interespecífica. Por outro lado, se houver a oportunidade de um evento síncrono de desovas muito próximas entre as espécies, estes dados indicam também que uma competição entre gametas poderá ocorrer. Esta hipótese é preocupante, pois a fecundação nos cruzamentos RG, RB e BG resulta na formação de larvas inviáveis e, portanto, pode

remover a contribuição potencial de gametas para a próxima geração das espécies puras. No caso de RG, cujas taxas de fecundação foram altas, a produção de larvas inviáveis pode, em longo prazo, ter um impacto importante sobre a contribuição de gametas da espécie nativa *C. rhizophorae*.

Bushek et al. (2008) demonstraram que a competição entre gametas de *C. virginica* e *C. ariakensis* pode causar uma redução na taxa de fecundação e na produção de larvas, devido às perdas pela formação de progênies inviáveis. Segundo estes autores, a extensão em que a competição entre gametas pode ocorrer depende de uma série de fatores incluindo a sincronização da desova, a habilidade de uma espécie estimular a outra a desovar, a longevidade de gametas e a densidade de espermatozoides.

Para espécies que coexistem naturalmente, como *C. rhizophorae* e *C. gasar*, é coerente afirmar que teriam coevoluído mecanismos para maximizar a probabilidade de fecundação intraespecífica e minimizar a hibridação interespecífica e a produção de larvas inviáveis. Apesar de estas espécies terem períodos sobrepostos de desova no ambiente natural (CHRISTO; ABSHER, 2006), observou-se uma grande variabilidade em seu desenvolvimento gonádico em laboratório, o que pode refletir as diferenças nos ciclos reprodutivos ou nos gatilhos de desova. Além disso, fêmeas de ostras são altamente espécie-específicas para a liberação de oócitos (GALTSOFF, 1964) e os espermatozoides preferencialmente fecundam oócitos da mesma espécie (BUSHEK et al., 2008).

Estes mecanismos, contudo, podem não existir quando uma nova espécie é introduzida e se torna invasora. A variação de fatores que influenciam a competição gamética podem fornecer a oportunidade para a coexistência das espécies ou levar a extinção de uma espécie com o espermatozoide menos eficiente (BUSHEK et al., 2008).

Informações disponíveis na literatura sobre a longevidade de gametas de *C. gigas* (HELM; MILLICAN, 1977; STEPHANO; GOULD, 1988), *C. rhizophorae* (SANTOS; NASCIMENTO, 1985) e *C. gasar* (TURECK, 2010), quando analisadas em conjunto, sugerem que os gametas de *C. gigas* são viáveis por mais tempo do que os de *C. gasar* e os de *C. rhizophorae*. A liberação de gametas sexualmente maduros desta espécie exótica na costa Sul do Brasil pode ocorrer no mês de março (FERREIRA et al., 2011), período que coincide com os picos de desova natural das ostras nativas (CHRISTO; ABSHER, 2006; GOMES et al., 2014).

A continuidade de pesquisas que envolvam cruzamentos entre

estas três espécies devem considerar a maturação de ostras nativas em laboratório, a fim de otimizar a sua qualidade gamética, como já ocorre com *C. gigas* (FERREIRA et al., 2011). É importante testar outras concentrações de gametas em salinidades diferentes e diminuir ao máximo o tempo para fecundação após a hidratação dos oócitos e a raspagem dos espermatozoides, de modo a estabelecer condições ótimas de interação sexual.

A hipótese de competição entre gametas de diferentes espécies deve ser testada experimentalmente, reproduzindo uma possível desova síncrona, principalmente para *C. rhizophorae* e *C. gigas*, cujos híbridos RG exibiram taxas de fecundação relativamente altas. É fundamental monitorar a expansão da invasão de *C. gigas* na área de coexistência com as espécies nativas sob um enfoque ecológico-evolutivo integrado, considerando que esta espécie apresenta um alto potencial de adaptação a diferentes condições ambientais (RUESINK et al., 2005) e que os seus espermatozoides podem fecundar os oócitos de *C. rhizophorae* e *C. gasar*.

Para separar o efeito da desova por “strip” sobre o sucesso de fecundação das espécies, principalmente de *C. gasar*, seria necessário testar a viabilidade de indução de pequenas desovas em massa dentro e entre as espécies. Após 24 h, as larvas resultantes de todas as desovas poderiam ser cultivadas em ambiente comum para avaliar crescimento e sobrevivência sob o efeito da competição.

Ainda, a identificação e comparação das sequências dos genes envolvidos no reconhecimento gamético em *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar*, em conjunto com os experimentos de hibridação e o uso de marcadores moleculares diagnósticos, poderiam contribuir grandemente na elucidação das possíveis interações reprodutivas dentro e entre estas três espécies. Estudos demonstraram que os genes codificantes das proteínas de reconhecimento gamético (“bindin”) regulam as interações entre oócitos e espermatozoides de ostras (MOY et al., 2008), exibem um alto grau de polimorfismo nas espécies *C. gigas*, *C. angulata* e *C. sikamea* (WU et al., 2011) e podem ser um componente chave para limitar a fecundação dentro e entre espécies.

CONCLUSÕES

A fecundação entre as espécies *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* é possível em uma direção: fêmeas *C. rhizophorae* x machos *C. gasar* (RB); fêmeas *C. rhizophorae* x machos *C. gigas* (RG); e fêmeas

C. gasar x machos *C. gigas* (BG). A partir da fecundação assimétrica, os zigotos desenvolvem-se normalmente para formar larvas-D que não sobrevivem após a primeira semana de idade. As análises PCR-RFLP das regiões 16S do DNA mitocondrial e ITS-2 do DNA nuclear confirmaram que as larvas RG são híbridos verdadeiros e podem ser usados como marcadores moleculares em estudos de hibridação interespecífica.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (MCT/MPA/FINEP/CT-AGRO-02/2010; CNPq/MPA - N° 42/2012). Às equipes dos laboratórios LMM-UFSC, LABCAI-UFSC e LBDM-UFRJ pelo apoio à pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSHER, T.M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento.** 1989. 185p. Tese (Doutorado em Oceanografia), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALLEN, S.K., GAFFNEY, P.M., SCARPA, J. AND BUSHEK, D. Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (gould) and *C. gigas* (thunberg). **Aquaculture** v.113, p.269-289, 1993.
- BANKS, M.A.; MCGOLDRICK, D.J.; BORGESON, W.; HEDGECOCK, D. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. **Mar. Biol.** v.121, p.127-135, 1994.
- BLANCHET, S. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. **Fish. Manag. Ecol.** v.19, p.120-132, 2012.
- BOUDRY, P.; COLLET, B.; CORNETTE, F.; HERVOUET, V. BONHOMME, F. High variance in reproductive success of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg revealed by microsatellite based

parentage analysis of multifactorial crosses. **Aquaculture** v.204, p.283-296, 2002.

BUSHEK, D.; KORNBLUH, WANG, H.; GUO, X.; DEBROSSE, G.; QUINLAN, J. Fertilization interference between *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea virginica*: a gamete sink? **J. Shellfish Res.** v.27, n.3, p.593-600, 2008.

CAMARA, M.D.; DAVIS, J.P.; SEKINO, M.; HEDGECOCK, D.; LI, G.; LANGDON, C.; EVANS, S. The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the Northern Ariake Sea, Japan. **J. Shellfish Res.** v.27, n.2, p.313-322, 2008a.

CHRISTO, S.W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná - Brasil): um subsídio ao cultivo.** 2006. 145p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia), Universidade Federal do Paraná.

CHRISTO, S.W.; ABSHER, T.M. Reproductive period of *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (LAMARK, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná Brazil. **J. Coastal Res.** v.2, n.39, p.1215-1218, 2006.

FAO. Cultured Aquatic Species Information Program. *Crassostrea gigas*. Cultured Aquatic Species Information Program. Text by Helm, M.M. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]**. Rome. Disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en. Updated 13 April 2005. [Cited 5 February 2015].

FERREIRA, J.F.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; FERREIRA, F.M. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.192-197, abr./jun. 2011. Disponível em <http://www.cbra.org.br>.

GAFFNEY, P.M.; BERNAT, C.M.; ALLEN, S.K. Gametic incompatibility in wild and cultured populations of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquaculture** v.115, p.273-284, 1993.

GOMES, C.H.A.M. **Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório.** 2009. 57p.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

GOMES, C.H.A.M.; SILVA, F.C.; LOPES, G.R.; MELO, C.M.R. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Braz. J. Biol.** v.74, n.4, p.967-976, 2014.

GOSLING, E. **Bivalve mollusks: biology, ecology and culture**. Oxford: Fishing News Books, 2003.

HEDGECOCK, D.; MCGOLDRICK, D.J.; BAYNE B. Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. **Aquaculture** v.137, p.285-298, 1995.

HELM, M.M.; MILLICAN, P.F. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture** v.11, p.1-12, 1977.

HELM, M.M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. (comp./ed.). Hatchery culture of bivalves. A practical manual. **FAO Fisheries Technical Paper**. n. 471. Rome, FAO. 2004. 177p.

HUO, Z.; WANG, Z.; YAN, X.; GAFFNEY, P.M. Fertilization, survival, and growth of *Crassostrea hongkongensis* ♀ x *Crassostrea ariakensis* ♂ hybrids in northern China. **J. Shellfish Res.** v.32, n.2, p.377-385, 2013.

HUVET, A.; GÉRARD, A.; LEDU, C.; PHÉLIPOT, P.; HEURTEBISE, S.; BOUDRY, P. Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? **Aquat. Living Resour.** v.15, p.45-52, 2002.

HUVET, A.; FABILOUX, C.; MCCOMBIE, H.; LAPÈGUE, S.; BOUDRY, P. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.272, p.141–152, 2004.

GALLAGER, S.M.; MANN, R. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. **Aquaculture** v.56, p.105-121.

GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. **Fish. Bull.** v.64, p.1-480, 1964.

GUSMÃO, J.; SOLÉ-CAVA, A.M. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. In: Blas, I. (ed), **Congresso Ibero-americano Virtual de Acuicultura, CIVA 2002 (www.civa2002.org)**. Zaragoza: Universidade de Zaragoza, 2002. p. 754–764.

KESSING, B.; CROOM, H.; MARTIN, A.; MCINTOSH, C.; OWEN, M.; PALUMBI, S. **The simple fool's guide to PCR**. Hawaii: Department of Zoology, University of Hawaii, 1989.

LANNAN, J.E.; ROBINSON, A.; BREESE, W.P. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. **Aquaculture** v.21, p.337-345.

LAPÈGUE, S., BOUTET, I., LEITÃO, A., HEURTEBISE, S., GARCIA, P., THIRIOT-QUIÉVREUX, C., BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biol. Bull.** v.202, p.232-242, 2002.

LAUNEY, S.; HEDGECOCK, D. High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. **Genetics** v.159, p.255–265, 2001.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A.M. Phylogeny and phylogeography of commercially important Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.426, p.197–212, 2011.

LEGAT, J.F.A. Reprodução, crescimento e sobrevivência da ostra nativa *Crassostrea gasar* cultivada nos Estados do Maranhão e Santa Catarina. 2015. 120p. Tese (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

LEITÃO, A.; BOUDRY, P.; LABAT, J-P.; THIRIOT-QUÉVREUX, C. Comparative karyological study of cupped oyster species. **Malacologia**, v.41, n.1, p.175-186, 1999.

MACKIE, G.L. Bivalves. In: TOMPA, A.S.; VERDONK, N.H.; VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. **The mollusca, Volume 7, Reproduction**. Orlando: Academic Press, 1984. p.351-418.

MELO, C.M.R.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. **Biol. Inv.** v.12, p.441-449, 2010a.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R.M.; GOULLETQUER, P. 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report** n.299. 2009. 42 p.

MOY, G.W.; SPRINGER, S.A.; ADAMS, S.L.; SWANSON, W.J.; VACQUIER, V.D. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm bindin. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.105, n. 6, p.1993-1998, 2008.

PERRY, W.L.; LODGE, D.M.; FEDER, J.L. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. **Syst. Biol.** v.51, n.2, p. 255 –275, 2002.

PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Res.** v.37, p.1598–1600, 2006.

RUESINK, J.L.; LENIHAN, H.S.; TRIMBLE, A.C.; HEIMAN, K.W.; MICHELI, F.; BYERS, J.E.; KAY, M.C. Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. **An. Rev. Ecol. Systemat.** v.36, p.643-689, 2005.

SANTOS F.M. **Influência da temperatura sobre o acúmulo de glicogênio e acompanhamento do ciclo sexual da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) em campo e laboratório, durante o verão.** 2001. 38p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

SANTOS, A.E.; NASCIMENTO, I.A. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828. **Aquaculture** v.47, p.335-352.

SILVEIRA, R.C.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.M.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster

Crassostrea brasiliana (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. **Braz. J. Biol.** v.71, p.557-562, 2011.

SOLETCHNICK, P.; HUVET, A.; LE MOINE, O.; RAZET, D.; GEAIRON, P.; FAURY, N.; GOULLETQUER, P.; BOUDRY, P. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. **Aquat. Living Resour.** v.15, p.243–250, 2002.

SOUZA, R.C.C.L.; CALAZANS, S.H.; SILVA, E.P. Impactos das espécies invasoras no ambiente aquático. **Ciência e Cultura** v.61, n.1, p. 35-41, 2009.

STEPHANO, J.L.; GOULD, M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture** v.73, p.295-307, 1988.

TARIS, N.; BARON, S.; SHARBEL, T.F.; SAUVAGE, C.; BOUDRY, P. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture Res.** v.36, p.516-518, 2005.

TEIXEIRA, R.M.; BARBOSA, J.S.P.; LÓPEZ, M.S.; FERREIRA-SILVA, M.A.G.; COUTINHO, R.; VILLAÇA, R.C. Bio-invasão marinha: os bivalves exóticos de substrato consolidado e suas interações com a comunidade receptora. **Oecologia Australis** v.14, n.2, p.381-402, 2010.

THOMPSON, R.J.; NEWELL, R.I.E.; KENNEDY, V.S.; MANN, R. Reproductive processes and early development. In: **The eastern oyster: *C. virginica***. Maryland: Maryland Sea Grant College, 1996. p.335-370.

TURECK, C. R. Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsidio ao cultivo. 2010. 140 p. Tese (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

WANG, Y.; XU, Z.; GUO, X. Differences in the rDNA-bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca). **Biol. Bull.** v.206, p.46-54, 2004.

WESTFALL, P.H., RANDALL, T.D., DROR, R., WOLFINGER R.D., HOCHBERG, Y. **Multiple comparisons and multiple test using SAS®**. Cary, USA: SAS Institute Inc. 1999. 644p.

WU; Q. XU, F.; BAO, Y.; Li, L.; ZHANG, G. Bindin gene from the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*, and divergence of the fucose lectin repeats of bindin among three species of *Crassostrea*. **J. Shellfish Res.** v.30, n.1, p.55-64, 2011

XU, F.; ZHANG, G.; LIU, X; ZHANG, S.; SHI, B.; GUO, X. Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea*. **J. Shellfish Res.** v.28, n.3, p.453-458, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, Z.; YAN, X.; YU, R.; KONG, J.; LIU, J.; LI, X.; LI, Y.; GUO, X. Laboratory hybridization between two oysters: *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis*. **J. Shellfish Res.** v.31, p.619–625, 2012.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; XIAO, S.; XIANG, Z.; WANG, Z.; YAN, X.; YU, Z. Artificial interspecific backcrosses between the hybrid of female *Crassostrea hongkongensis* x male *C. gigas* and the two parental species. **Aquaculture**. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.013>

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 CONCLUSÕES GERAIS

O cloreto de magnésio ($MgCl_2$) pode ser usado efetivamente como relaxante muscular nas ostras cultivadas do gênero *Crassostrea*, para a separação das espécies por sexo e para estudos futuros de reprodução em laboratório. Os procedimentos de anestesia e amostragem do tecido gonádico não apresentaram efeitos deletérios sobre a recuperação e a sobrevivência dos animais das três espécies estudadas. O $MgCl_2$ também não afetou negativamente a capacidade de fecundação e o desenvolvimento de larvas-D de *C. gigas*. O tempo para a anestesia e recuperação dos animais variou com a espécie. Em *C. rhizophorae* e *C. gigas*, 100% das ostras foram anestesiadas após 360 min; em *C. gasar*, 87% dos animais foram anestesiados após 720 min. As espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar* levaram mais tempo (≥ 240 min) para se recuperar da anestesia do que *C. gigas* (150 min).

A hibridação entre as espécies *C. rhizophorae*, *C. gasar* e *C. gigas* é possível em uma direção: oócitos de *C. rhizophorae* x espermatozoides de *C. gasar* (RB); oócitos de *C. rhizophorae* x espermatozoides de *C. gigas* (RG); e oócitos de *C. gasar* x espermatozoides de *C. gigas* (BG). A partir da fecundação, os zigotos híbridos desenvolvem-se normalmente para formar larvas-D que não sobrevivem após a primeira semana de idade. A formação de larvas BG e RB ocorreu em apenas um caso isolado durante o período experimental de 2012 a 2014. A produção de larvas RG foi consistente e relativamente alta ao longo de todo o período. As análises de marcadores de DNA mitocondrial e DNA nuclear confirmaram que as larvas RG são híbridos verdadeiros e podem ser usados em estudos subsequentes de hibridação.

4.2 SUGESTÕES

O protocolo de anestesia estabelecido para *C. gigas* (SUQUET et al., 2009) e testado neste estudo para as espécies de ostras nativas brasileiras foi eficiente na resposta de *C. rhizophorae*. No entanto, para *C. gasar*, concentrações iguais e maiores de cloreto de magnésio devem ser investigadas em diferentes condições ambientais (jejum, temperatura, salinidade e pH), visando à otimização da técnica para a esta espécie.

A continuidade de pesquisas que envolvam cruzamentos entre as ostras do gênero *Crassostrea* devem considerar o uso da anestesia para a separação das espécies por sexo e o condicionamento e maturação das espécies nativas em laboratório para melhorar a viabilidade dos gametas na reprodução. Além disso, a técnica de anestesia poderá ser usada para estudos sobre reversão sexual, auxiliando na compreensão dos fatores que determinam o sexo em ostras cultivadas no Brasil.

Sugere-se testar a hipótese de competição entre gametas das espécies, reproduzindo em laboratório eventos de desova síncrona, principalmente entre *C. rhizophorae* e *C. gigas*, com o objetivo de prever os riscos de uma redução na produção de larvas viáveis de *C. rhizophorae* devido à geração de larvas híbridas inviáveis.

Sugerem-se ainda estudos comparativos de expressão gênica no reconhecimento gamético em *C. gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar*, associados à condução de cruzamentos experimentais e ao uso de marcadores moleculares diagnósticos, de forma a elucidar os mecanismos de interação reprodutiva dentro e entre espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABSHER, T.M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento**. 1989. 185p. Tese (Doutorado em Oceanografia), Universidade de São Paulo, São Paulo.

AFINOWI, M.A. 1984. **The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* cultivation and potential in the Niger Delta (Nigeria)**. Lagos: Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research, (Technical Paper: 14), 14p.

AJI, L.P. Review: Spawning Induction in Bivalve. **Jurnal Penelitian Sains** v.14, n.2, p.33-36, 2011.

AKABOSHI, S.; PEREIRA, O. M. 1981. Ostreicultura na região lagunar-estuarina de Cananéia, São Paulo, Brasil. I. Captação de larvas de ostras, *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), em ambiente natural. **Bol. Inst. Pesca** v.8, p.87-104.

ALLEN, S.K.; GAFFNEY, P.M.; EWART, J.W. Genetic improvement of the eastern oyster for growth and disease resistance in the Northeast. **NRAC Fact Sheet** n.210, 1993.

ALLEN, S.K., GAFFNEY, P.M., SCARPA, J. AND BUSHEK, D. Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). **Aquaculture** v.113, p.269-289, 1993.

AMARAL, V.S.; SIMONE, L.R.L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **J. Mar. Biol. Ass. UK** v.94, n.4, p.811-836, 2014.

ANDREWS, J.D. Pelecypoda: Ostreidae. In: Giese, A.C., Pearse, J.S. **Reproduction of marine invertebrates**. New York: Academic Press, 1979. p. 293-341.

AREIAS, D. **Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thundberg, 1795)**. 2012. 74p. Dissertação (Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

BATISTA, F.M.; LEITÃO, A.; FONSECA, V.G.; BEN-HAMADOU, R.; RUANO, F.; HENRIQUE, M.A.; GUEDES-PINTO, H.; BOUDRY, P. et al. Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v.352, p.226-233, 2007.

BOUDRY, P.; COLLET, B.; CORNETTE, F.; HERVOUET, V. BONHOMME, F. High variance in reproductive success of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg revealed by microsatellite based parentage analysis of multifactorial crosses. **Aquaculture** v.204, p.283-296, 2002.

BOUDRY, P., DEGREMONT, L. TARIS, A., MCCOMBIE, H., HAFFRAY, P., ERNANDE, B. Genetic variability and selective breeding for traits of aquacultural interest in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). **Bull. Aquacul. Assoc. Canada** v.104, n.2, p.12-18, 2004.

BOULAIS, M.; CORPOREAU, C.; HUVET, A. BERNARD, I.; QUERE, C.; QUILLIEN, V.; FABILOUX, C.; SUQUET M. Assessment of oocyte and trochophore quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v.437, p. 201-207, 2015.

BLANCHET, S. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. **Fish. Manag. Ecol.** v.19, p.120-132, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília, 2013. 60p.

BRANDRIFF, B.; MOY G.W.; VACQUIER, V.D. Isolation of sperm bindin from the oyster (*Crassostrea gigas*). **Gamete Res.** v.1, p.89-99, 1978.

BUSHEK, D.; KORNBLUH; WANG, H.; GUO, X.; DEBROSSE, G.; QUINLAN, J. Fertilization interference between *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea virginica*: a gamete sink? **J. Shellfish Res.** v.27, n.3, p. 593-600, 2008.

BUTT, D.; O'CONNOR, S.J.; KUCHEL, R.; O'CONNOR, W.A.; RAFTOS, D.A. Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on

the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). **Aquaculture** v.275, p.342-346, 2008.

CAMARA, M.D.; DAVIS, J.P.; SEKINO, M.; HEDGECOCK, D.; LI, G.; LANGDON, C.; EVANS, S. The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the Northern Ariake Sea, Japan. **J. Shellfish Res.** v.27, n.2, p.313-322, 2008.

CARRANZA, A.; DEFEO O.; BECK, M. Diversity, conservation status and threats to native oysters (Ostreidae) around the Atlantic and Caribbean coasts of South America. **Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.** v.19, p. 344-353, 2009.

CARRIKER, M.R.; GAFFNEY, P.M. A catalogue of selected species of living oysters (Ostreacea) of the world. In: **The eastern oyster: *C. virginica***. Maryland: Maryland Sea Grant College, 1996. p. 1-18.

CASTILHO-WESTPHAL, G.G.; MAGNANI, F.P.; OSTRENSKY, A. Gonad morphology and reproductive cycle of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) in the Baía de Guaratuba, Paraná, Brazil. **Acta Zoologica (Stockholm)** v.96, p.99-107, 2015.

CHRISTO, S.W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná - Brasil): um subsídio ao cultivo**. 2006. 145p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia), Universidade Federal do Paraná.

CHRISTO, S.W.; ABSHER, T.M. Reproductive period of *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (LAMARK, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná Brazil. **J. Coastal Res.** v.2, n.39, p.1215-1218, 2006.

CHRISTO, S.W.; ABSHER, T.M. Crescimento da prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). **B. Inst. Pesca** v.34, n.1, p.71-77, 2008.

CORDES, J.F.; XIAO, J.; REECE, K.S. Discrimination of nine *Crassostrea* oyster species based upon Restriction Fragment-Length Polymorphism analysis of nuclear and mitochondrial DNA markers. **J. Shellfish Res.** v.27, n.5, p.1155-1161, 2008.

CORPOREAU, C.; VANDERPLANCKE, G.; BOULAIS, M.;

SUQUET, M.; QUÉRÉ, C.; BOUDRY, P.; HUVET, A.; MADEC, S. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **J. Proteomics** v.75, n.18, p.5554-5563, 2012.

COSTA-PIERCE, B.A. Ecology as the paradigm for the future of aquaculture. In: **Ecological aquaculture the evolution of the blue revolution**. Oxford: Blackwell Science, 2002. p. 339-372.

CRUZ, F.L.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. Intraspecies and interspecies hybrids in *Haliotis*: natural and experimental evidence and its impact on abalone aquaculture. **Reviews in Aquaculture** v.3, p.74-99, 2011.

DÉGREMONT, L.; ERNANDE, B.; BÉDIER, E.; BOUDRY, P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth **Aquaculture** v.262, p.41-53, 2007

DINAMANI, P. Introduced Pacific oysters in New Zealand. In: Leffler, M., Greer, J. **The Ecology of *Crassostrea gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington State**. University of Maryland Sea Grant publication UM - SG - TS - 92.07. College Park, MD: Maryland Sea Grant College. 1992. p. 9-12.

FABIOUX, C.; HUVET, A.; SOUCHU, P.; PENNEC, M.; POUVREAU, S. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. **Aquaculture** v.250, n.1-2, p.458-470, 2005.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2012**. Rome, 2014. 223p.

FAO. Yearbook of Fishery Statistics: Summary tables of Aquaculture. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]**. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>. Acesso em fevereiro de 2015.

FAO. Cultured Aquatic Species Information Program. *Crassostrea gigas*. Cultured Aquatic Species Information Program. Text by Helm, M.M. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]**. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en. Updated 13 April 2005. [Cited 5 February 2015].

FERREIRA, J.F.; BESSEN K.; WORMSBECKER, A.G.; SANTOS R.F. Physical-chemical parameters of seawater mollusk culture sites in Santa Catarina, Brazil. **J. Coastal Res.**, v.39, p.1122-1126, 2004.

FERREIRA, M. A. P.; PAIXÃO, L. F.; ALCÂNTARA-NETO, C. P.; SANTOS, S. S. D.; ROCHA, R. M. Morphological and morphometric aspects of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) oocytes in three stages of the gonadal cycle. **Int. J. Morphol.** v.24, n.3, p.437-442, 2006.

FERREIRA, J.F.; OLIVEIRA NETO, F.M. Cultivo de Moluscos em Santa Catarina In: Barroso, G.F., Poersch, H.S., Cavalli, R.O. **Sistemas de cultivo aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócio-econômicos**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p. 87-96.

FERREIRA, J.F.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; FERREIRA, F.M. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.192-197, abr./jun. 2011. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

GAFFNEY, P.M.; ALLEN, S.K., JR. Hybridization among *Crassostrea* species: a review. **Aquaculture** v.116, p.1-13, 1993.

GAFFNEY, P.M.; BERNAT, C.M.; ALLEN, S.K., JR. Gametic incompatibility in wild and cultured populations of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquaculture** v.115, p.273-284, 1993.

GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. **Fish. Bull.** v.64, p.1-480, 1964.

GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUE, M.B. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliana* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25°S; 48°W). **B. Inst. Pesca** v.26, n.2, p. 147-162, 2000.

GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; HILSDORF, A.W.S. Molecular identification and distribution of mangrove oysters (*Crassostrea*) in an estuarine ecosystem in Southeast Brazil: implications for aquaculture and fisheries management **Aquaculture Res.** v.44, p.1589-1601, 2013.

GJEDREM, T. **Selection and breeding programs in Aquaculture.** Netherlands: Springer, 2005. 364p.

GOMES, C.H.A.M.; SILVA, F.C.; LOPES, G.R.; MELO, C.M.R. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Braz. J. Biol.** v.74, n.4, p.967-976, 2014.

GOSLING, E. **Bivalve mollusks: biology, ecology and culture.** Oxford: Fishing News Books, 2003. 443p.

GUIMARÃES, I.M.; ANTONIO, I.G.; PEIXOTO, S.; OLIVERA, A. Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae*. **Arq. Ciên. Mar** v.4, n.1, p.118-122, 2008.

GUO, X. M.; HEDGECOCK, D.; HERSHBERGER, W. K.; COOPER, K.; ALLEN, S. K. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Evolution** v.52, p.394-402, 1998.

HEDGECOCK D. 1994. Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? **In: Beaumont A. (ed.), Genetics and evolution of aquatic organisms.** London: Chapman & Hall. p. 122-134.

HEDGECOCK, D.; MCGOLDRICK, D.J.; BAYNE B. Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. **Aquaculture** v.137, p.285-298, 1995.

HEDGECOCK, D; DAVIS, J.P. Heterosis for yield and crossbreeding of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquaculture** v.272, n.S1, p.S17-S29, 2007.

HEDGECOCK, D; PUDOVKIN, A.I. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. **Bull. Mar. Sci.** v.87, n.4, p.971-1002, 2011.

HEDRICK, P.W.; HEDGECOCK, D. Sex determination: genetic models for oysters. **J. Heredity** v.101, n.5, p.602-611, 2010.

HELM, M.M.; MILLICAN, P.F. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture** v.11, p.1-12, 1977.

HELM, M.M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. (comp./ed.). Hatchery culture of bivalves. A practical manual. **FAO Fisheries Technical Paper**. n. 471. Rome, FAO. 2004. 177p.

HOFFMAN, E.E.; POWELL, E.N.; BOCHENEK, E.A.; KLINCK, J.M. A modeling study of the influence of environment and food supply on survival of *Crassostrea gigas* larvae. **ICES J. Mar. Sci.** v. 61, p.596-616, 2004.

HUO, Z.; WANG, Z.; YAN, X.; GAFFNEY, P.M. Fertilization, survival, and growth of *Crassostrea hongkongensis* ♀ x *Crassostrea ariakensis* ♂ hybrids in northern China. **J. Shellfish Res.** v.32, n.2, p.377-385, 2013.

HUO, Z.; WANG, Z.; YAN, X.; YU, R. Hybridization between *Crassostrea hongkongensis* and *Crassostrea ariakensis* at different salinities. **J. World Aquaculture Soc.** v.45, n.2, p.226-232, 2014.

HUVET, A.; GÉRARD, A.; LEDU, C.; PHÉLIPOT, P.; HEURTEBISE, S.; BOUDRY, P. Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? **Aquat. Living Resour.** v.15, p.45-52, 2002.

HUVET, A.; FABIOUX, C.; MCCOMBIE, H.; LAPÈGUE, S.; BOUDRY, P. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.272, p.141-152, 2004.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007: grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília, 2007, 151p.

IGNACIO, B.L., ABSHER, T.M., LAZOSKI, C., SOLÉ-CAVA, A.M. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Mar. Biol.** v.136, p.987-991, 2000.

KLINBUNGA, S.; KHAMNAMTONG, B.; PUANGLARP, N.; JARAYABHAND, P.; YOOSUKH, W.; MENASVETA, P. Molecular taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16S, and 18S rDNA polymorphism. **Mar. Biotechnol.** v.7, p.306–317, 2005.

KONG, N.; LI, Q.; YU, H.; KONG, L-F. Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree. **Aquaculture Res.** v.46, p.499–508, 2015.

LANAN, J.E. Broodstock management of *Crassostrea gigas*, I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. **Aquaculture** v.21, p.323-336, 1980.

LANNAN, J.E.; ROBINSON, A.; BREESE, W.P. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. **Aquaculture** v.21, p.337-345, 1980.

LANGDON, C.J.; JACOBSON, D.P.; EVANS, F.; BLOUIN, M.S. The molluscan broodstock program – improving Pacific oyster broodstock through genetic selection. **J. Shellfish Res.** v.19, p.616, 2000.

LAPÈGUE, S., BOUTET, I., LEITÃO, A., HEURTEBISE, S., GARCIA, P., THIRIOT-QUIÉVREUX, C., BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biol. Bull.** v.202, p.232-242, 2002.

LAZOSKI, C. **Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea* spp.)**. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A.M. Phylogeny and phylogeography of commercially important Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.426, p.197–212, 2011.

LEGAT, J.F.A. Reprodução, crescimento e sobrevivência da ostra nativa *Crassostrea gasar* cultivada nos Estados do Maranhão e Santa Catarina. 2015. Tese. 120p. (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

LEITÃO, A.; BOUDRY, P.; LABAT, J-P.; THIRIOT-QUÉVREUX, C. Comparative karyological study of cupped oyster species. **Malacologia**, v.41, n.1, p.175-186, 1999.

LEITÃO, A.; CHAVES, R.; SANTOS, S.; GUEDES-PINTO, H.; BOUDRY, P. Interspecific hybridization in oysters: restriction enzyme digestion chromosome banding confirms *Crassostrea angulata* x

Crassostrea gigas F1 hybrids. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v.343, p.253-260, 2007.

LEMOS, M.B.N., NASCIMENTO, I.A., DE ARAUJO, M. M. S., PEREIRA, S.A., BAHIA, I., SMITH, D.H. The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. **J. Shellfish Res.** v.3, p.187-192, 1994.

LENZ, T.; BOEHS, G. Reproductive cycle of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) in Camamu Bay, Bahia, Brasil. **Rev. Biol. Trop.** v.59, n.1, p.137-49, 2011.

LOPES, G.R.; GOMES, C.H.A.M.; TURECK, C.R.; MELO, C.M.R. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesq. Agropec. Bras.** v.48, n.7, p.975-982, 2013.

LOOSANOFF, V.L.; DAVIS, H.C. Rearing of bivalve molluscs. **Adv. Mar. Biol.** v.1, p.1-136, 1963.

LUDWIG, S.; PATELLA, R.; STOIEV, S.; CASTILHO-WESTPHAL, G.; GIROTTO, M.V.F.; OSTRENSKY, A. A molecular method to detect and identify the native species of southwestern Atlantic *Crassostrea* (Mollusca: Ostreidae). **Zoologia** v.28, n.4, p.420-426, 2011.

MACKIE, G.L. Bivalves. In: TOMPA, A.S.; VERDONK, N.H.; VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. **The mollusca, Volume 7, Reproduction.** Orlando: Academic Press, 1984. p. 351-418.

MELO, C.M.R.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. **Biol. Inv.** v.12, p.441-449, 2010a.

MELO, A.G.C.; VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P. M.; REECE, K. S.; TAGLIARO, C. H. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genet. Mol. Biol.** v.33, n.3, p.564-572, 2010b.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R.M.; GOULLETQUER, P. 2009. Alien

species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report** n. 299. 2009. 42p.

MIRANDA, M.B.B.; GUZENSKI, J. Cultivo larval da ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) sob diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade. **Arq. Ciên. Mar** v.32, p.73-84, 1999.

MONTANHINI NETO, R.M.; ZENI, T.O.; LUDWIG, S.; HORODESKY, A.; GIROTTO, M.V.F.; CASTILHO-WESTPHAL, G.G; OSTRENSKY, A. Influence of environmental variables on the growth and reproductive cycle of *Crassostrea* (Mollusca, Bivalvia) in Guaratuba Bay, Brazil. **Invert. Reprod. Develop.** v.57, n.3, p.208-218, 2012.

MOY, G.W.; SPRINGER, S.A.; ADAMS, S.L.; SWANSON, W.J.; VACQUIER, V.D. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm bindin. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.105, n. 6, p.1993-1998, 2008.

MURANAKA, M.S.; LANNAN, J.E. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. **Aquaculture** v.39, p.217-228, 1984.

NALESSO, R.C.; PARESQUE, K.; PIUMBINI, P.P.; TONINI, J.F.R.; ALMEIDA, L.G.; NÍCKEL, V.M. Oyster spat recruitment in Espírito Santo State, Brazil, using recycled materials. **Braz. J. Oceanogr.** v.56, n.4, p.281-288, 2008.

NASCIMENTO, I.A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. In: Menzel, W. **Estuarine and marine bivalve mollusk culture**. Boston: CRC Press, 1991. p.125-134.

PAIXÃO, L.; FERREIRA, M.B.; NUNES, Z.; FONSECA-SIZOA, F.; ROCHA, R. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster *Crassostrea gasar*: Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture** v.380-383, p.6-12, 2013.

PERRY, W.L.; LODGE, D.M.; FEDER, J.L. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. **Syst. Biol.** v.51, n.2, p.255-275, 2002.

PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Res.** v.37, p.1598-1600, 2006.

POLI, C.R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*). In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. (Ed.) **Aqüicultura - experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004, p. 251–266.

POWELL, E.N.; BOCHENEK, E.A.; KLINCK, J.M.; HOFMANN, E.E. Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. **Aquaculture** v.210, p.89– 117, 2002.

RAMOS, C.O.; GOMES, C.H.A.; MAGALHÃES, A.R.M.; SANTOS, A.I.; MELO, C.M.R. Maturation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* at different temperatures in the laboratory. **J. Shellfish Res.** v.33, n.1, p.187-194, 2014.

REECE, K.S.; CORDES, J.F.; STUBBS, J.B.; HUDSON, K.L.; FRANCIS, E.A. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. **Mar. Biol.** v.153, p.709-721, 2008.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande: Ed. FURG, 1994.

RODRIGUEZ-ROMERO, F.; OCA, M.G.M. Los cromossomas del híbrido experimental de *Crassostrea virginica* Gmelin 1791 y *Crassostrea rhizophorae* Guilding 1828 (PseudoLamellibranchiata: Ostreidae). **Ciencias Marinas** v.24, n.1, p.55-63, 1998.

RUESINK, J.L.; LENIHAN, H.S.; TRIMBLE, A.C.; HEIMAN, K.W.; MICHELI, F.; BYERS, J.E.; KAY, M.C. Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. **An. Rev. Ecol. Systemat.** v.36, p.643-689, 2005.

RUIZ, C.; ABAD, M.; SEDANO, F.; GARCIA-MARTIN, L.O.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, J.P. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. **J.**

Exp. Mar. Biol. Ecol. v.155, p.249-262, 1992.

SANTA CATARINA, Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese informativa da maricultura 2014**. Florianópolis, 2015. 8p.

SANTOS, A.E.; NASCIMENTO, I.A. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828. **Aquaculture** v.47, p.335-352.

SILVEIRA, R.C.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.M.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. **Braz. J. Biol.** v.71, p.557-562, 2011.

SOLETCHNICK, P.; HUVET, A.; LE MOINE, O.; RAZET, D.; GEAIRON, P.; FAURY, N.; GOULLETQUER, P.; BOUDRY, P. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. **Aquat. Living Resour.** v.15, p.243-250, 2002.

SONG, Y.P.; SUQUET, M.; QUÉAU, I.; LEBRUN, L. Setting of a procedure for experimental fertilization of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. **Aquaculture** v.287, p.311–314, 2009

SOUZA, R.C.C.L.; CALAZANS, S.H.; SILVA, E.P. Impactos das espécies invasoras no ambiente aquático. **Ciência e Cultura** v. 61, n.1, p. 35-41, 2009.

STEPHANO, J.L.; GOULD, M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture** v.73, p.295-307, 1988.

SUQUET, M.; AMOURDA, C.; MINGANT, C.; QUÉAU, I.; LEBRUN, L.; BRIZARD, R. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. **Aquaculture** v.273, p.503–508, 2007.

SUQUET, M.; KERMOYSAN, G.; ARAYA, R.G.; QUEAU, I.; LEBRUN, L.; SOUCHU, P.L.; MINGANT, C. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquat. Living Resour.** v.22, p.29–34, 2009.

SUQUET, M.; ARAYA, R. G.; LEBRUN, L.; QUEAU, I.; MINGANT, C.; ROBERT, R. Anesthesia and gonad sampling in the European flat oyster (*Ostrea edulis*). **Aquaculture**, v.308, p.196-198, 2010.

TEIXEIRA, R.M.; BARBOSA, J.S.P.; LÓPEZ, M.S.; FERREIRA-SILVA, M.A.G.; COUTINHO, R.; VILLAÇA, R.C. Bioinvasão marinha: os bivalves exóticos de substrato consolidado e suas interações com a comunidade receptora. **Oecologia Australis** v.14, n.2, p.381-402, 2010.

THOMPSON, R.J.; NEWELL, R.I.E.; KENNEDY, V.S.; MANN, R. Reproductive processes and early development. In: **The eastern oyster: C. virginica**. Maryland: Maryland Sea Grant College, 1996. p. 335-370.

TRIVEDI, S.; ALOUFI, A.A.; ANSARI, A.A.; GHOSH, S.K. Molecular phylogeny of oysters belonging to the genus *Crassostrea* through DNA barcoding. **J. Entomol. Zool. Studies** v.3, n.1, p.21-26, 2015.

TURECK, C. R. Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsidio ao cultivo. 2010, 140p. Tese (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

UTTING, S.D.; SPENCER, B.E. **The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles**. Lowestoft: Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Directorate of Fisheries. Laboratory Leaflet n.68, 1991. 31p.

UTTING, S.D.; MILLICAN, P.F. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. **Aquaculture** v.155, p.45-54, 1997.

VARELA, E.S.; BEASLEY, C.N.; ROBERT BEASLEY, C.N.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N.S.; TAGILARO, C.H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **J. Mollusc. Studies** v. 73, p. 229-234, 2007.

VELASCO, L.A.; VEGA, D.; ACOSTA, E.; Y BARROS, J. Reproducción artificial de la ostra del mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828 en el Caribe Colombiano. **Rev. Intropica** v.5, p. 47-56, 2010.

WANG, Y.; XU, Z.; GUO, X. Differences in the rDNA-bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca). **Biol. Bull.** v.206, p.46-54, 2004.

WARD, R. D.; ENGLISH, L. J.; MCGOLDRICK, D. J.; MAGUIRE, G. B.; NELL, J. A.; THOMPSON, P. A. Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. **Aquaculture Res.** v.31, p.35-44, 2000.

WILLIAMS, G.C. **Sex and evolution.** Princeton : Princeton University Press. 1975.

WU; Q. XU, F.; BAO, Y.; Li, L.; ZHANG, G. Bindin gene from the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*, and divergence of the fucose lectin repeats of bindin among three species of *Crassostrea*. **J. Shellfish Res.** v.30, n.1, p.55-64, 2011.

XU, F.; ZHANG, G.; LIU, X.; ZHANG, S.; SHI, B.; GUO, X. Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea*. **J. Shellfish Res.** v.28, n.3, p.453-458, 2009.

ZHANG, N.A.; XU, F.; GUO, X. Genomic analysis of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a mollusc. **Genes, Genome, Genetics** v.4, p.2207-2217, 2014.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; XIAO, S.; XIANG, Z.; WANG, Z.; YAN, X.; YU, Z. Artificial interspecific backcrosses between the hybrid of female *Crassostrea hongkongensis* x male *C. gigas* and the two parental species. **Aquaculture**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.013>.

ZHENG, H.; ZHANG, G.; GUO, X.; LIU, X. Heterosis between two stocks of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819). **J. Shellfish Res.** v.25, n.3, p.807-812, 2006.